

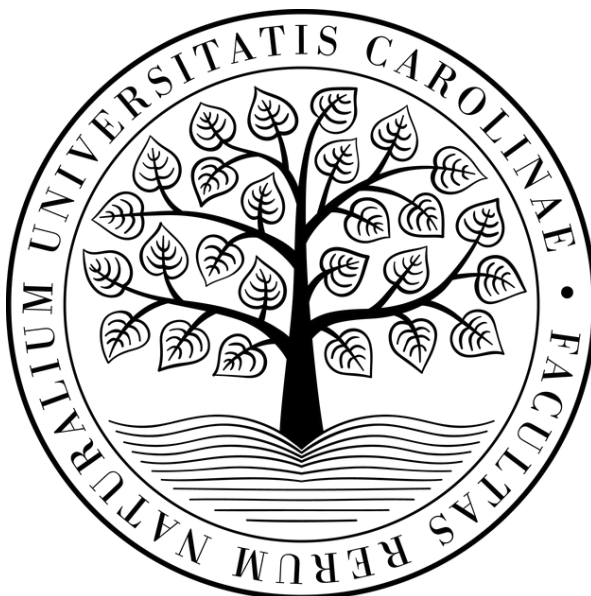
UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tereza Kadavá

**Strukturní charakterizace interakce dvouvláknových DNA  
s transkripčním faktorem**

Structural characterization of dsDNA and transcription factor  
interactions

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jan Fiala

Praha 2020

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

## ABSTRAKT

Transkripční faktory z rodiny proteinů TEAD jsou důležitou součástí mnohých eukaryotických regulačních procesů. Jsou součástí Hippo signální dráhy a podílí se na kontrole diferenciaci buněk a apoptózy. Zájem o tyto proteiny též souvisí s jejich spojením s onkologickými onemocněními. DNA-vazebná doména TEAD transkripčních faktorů interaguje s M-CAT elementy dvouvláknové DNA, kterými jsou i sekvence dsDNA z exonu a enhanceru genu *C-MYC*, jejichž interakce s DNA-vazebnou doménou proteinů TEAD byla v této práci studována především iontovou mobilitou ve spojení s hmotnostní spektrometrií za použití nativní ionizace nanoelektrosprejem.

Studiu proteinu TEAD1-DBD a jeho dsDNA komplexů předcházela produkce DNA-vazebné domény TEAD1 dle již optimalizovaného protokolu. TEAD1-DBD a jeho komplexy byly dále studovány pomocí kolizně indukované aktivace a zahřívání sprejovaného roztoku při použití nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou. Při kolizní aktivaci bylo pozorováno kolizně indukované rozbalování proteinu i obou jeho komplexů s DNA. Při zahřívání sprejovaného roztoku bylo sledováno tavení dsDNA i komplexů a z naměřených hodnot byly určeny teploty tavení jednotlivých vzorků. Pomocí kalibrace iontové mobility s putující vlnou byly určeny kolizní průřezy jednotlivých molekul.

## KLÍČOVÁ SLOVA

dsDNA, transkripční faktor, nativní elektrosprej, pohyblivost iontů, hmotnostní spektrometrie

# ABSTRACT

Transcription factors from TEAD protein family play an important role in various eukaryotic regulatory processes. They are partly responsible for cell differentiation and apoptosis due to their involvement in the Hippo signalling pathway. Scientific interest in this protein family is mainly because they are associated with carcinogenesis. DNA-binding domain of TEAD transcription factors interacts with M-CAT element of double-stranded DNA, which is present also in enhancer and exon of *C-MYC* gene. Interaction between TEAD1 DNA-binding domain and *C-MYC* dsDNA was investigated in this bachelor's thesis mainly by ion mobility in connection with mass spectrometry using native nESI ionization.

For the further analysis of TEAD1-DBD and its complexes with dsDNA, the protein was firstly recombinantly expressed by the optimized protocol in our laboratory. Investigation of TEAD1-DBD and its complexes was done using two IM-MS activations. Firstly, the collision-induced unfolding was performed and afterwards perturbation of the sample by preheating nESI emitter was done. The first activation led to the collision-induced unfolding of some charge states of TEAD1-DBD protein and both protein–DNA complexes. The second activation performed by heating of nESI emitters led to temperature melting of both dsDNA and protein–DNA complexes. From obtained data melting temperatures of dsDNA and TEAD1-DBD dsDNA complexes were determined. By calibration of travelling wave ion mobility collision cross-sections of analysed molecules were calculated.

# KEYWORDS

dsDNA, transcription factor, native electrospray, ion mobility, mass spectrometry  
[IN CZECH]

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla využít možnosti poděkovat svému školiteli, RNDr. Petru Novákovi, Ph. D., za vedení této práce a veškerý čas a ochotu, se kterou se mi věnoval. Velké díky patří též konzultantovi Mgr. Janu Fialovi za neskutečnou trpělivost, všechny rady a obrovskou pomoc. Též děkuji celému kolektivu laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za přátelské přijetí a milou atmosféru. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali a podporovali mě, jak při přípravě této práce, tak během celého studia.

# OBSAH

1. Literární přehled .....	10
1.1 Transkripční faktory a regulace genové exprese .....	10
1.1.1 Struktura transkripčních faktorů .....	10
1.1.1.1 Klasifikace transkripčních faktorů a jejich rodiny .....	12
1.1.2 TEAD rodina transkripčních faktorů .....	13
1.1.2.1 Regulační doména proteinů TEAD (TEAD YBD) .....	14
1.1.2.2 TEA doména (DNA vazebná doména proteinů TEAD) .....	15
1.2 Hmotnostní spektrometrie a její aplikace pro studium biomolekul .....	16
1.2.1 Instrumentace ve hmotnostní spektrometrii .....	17
1.2.2 Ionizace .....	18
1.2.3 Nativní hmotnostní spektrometrie .....	20
1.2.4 Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií .....	21
1.2.4.1 Instrumentace v iontové mobilitě .....	22
1.2.4.2 Aktivace a iontová mobilita ve spojení s MS .....	25
2. Cíle práce .....	26
3. Materiál a metody .....	27
3.1 Použité chemikálie .....	27
3.1.1 Roztoky (pufrů a médií) .....	28
3.1.2 Užívané bakteriální kmeny .....	29
3.1.3 Vektory a oligonukleotidy .....	29
3.2 Použité přístroje a materiál .....	29
3.2.1 Použité softwarové nástroje .....	31
3.3 Použité metody .....	31
3.3.1 Rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD .....	31
3.3.1.1 Transformace buněk .....	31
3.3.1.2 Příprava noční kultury .....	32
3.3.1.3 Vlastní produkce proteinu TEAD1-DBD .....	32
3.3.1.4 Izolace TEAD1-DBD .....	33
3.3.1.5 Afinitní chromatografie .....	33
3.3.1.6 Dialýza, štěpení a odstranění histidinové kotvy .....	34
3.3.1.7 Gelová permeační chromatografie .....	35

3.3.1. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS .....	35
3.3.2. Ověření schopnosti proteinu vázat dvouvláknovou DNA .....	37
3.3.2.1 Nativní gelová elektroforéza .....	37
3.3.3. Studium proteinu TEAD1-DBD a jeho komplexů s DNA .....	39
3.3.3.1 Příprava vzorků pro nativní hmotnostní spektrometrii .....	39
3.3.3.2 IM-MS analýza vzorků .....	40
4. Výsledky .....	42
4.1. Rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD .....	42
4.1.1 Afinitní chromatografie .....	42
4.1.2 Gelová permeační chromatografie .....	43
4.1.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS .....	44
4.1.4 Nativní ionizace elektrosprejem .....	46
4.2. Ověření schopnosti proteinu TEAD1-DBD vázat dvouvláknovou DNA .....	47
4.2.1 Nativní gelová elektroforéza .....	47
4.2.2 Nativní ionizace elektrosprejem .....	49
4.3. Studium proteinu a protein–DNA komplexů pomocí nativní hmotnostní spektrometrie .....	49
4.3.1 Kalibrace iontové mobility .....	50
4.3.2 Kolizně indukované rozbalování (CIU) .....	51
4.3.2.1 Dvouvláknová DNA (C-MYC enhancer a C-MYC exon) .....	51
4.3.2.2 Protein TEAD1-DBD .....	53
4.3.2.3 Komplexy TEAD1-DBD s dvouvláknovou DNA .....	54
4.3.3 Zahřívání sprejovaného roztoku .....	56
4.3.3.1 Dvouvláknová DNA (C-MYC enhancer a C-MYC exon) .....	56
4.3.3.2 Protein TEAD1-DBD .....	58
4.3.3.3 Komplexy TEAD1-DBD s dvouvláknovou DNA .....	60
5. Diskuze .....	63
6. Závěr .....	68
7. Použitá literatura .....	69

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP-MALDI	MALDI ionizace za atmosférického tlaku (z anglického „atmospheric pressure MALDI“), zkratku MALDI viz níže
bLG	$\beta$ -laktoglobulin
bZip	rodina transkripčních faktorů se strukturou leucinového zipu
CCS	kolizní průřez $\Omega$ (z anglického „collision cross-section“)
CE	kapilární elektroforéza (z anglického „capillary electrophoresis“)
CID	kolizně indukovaná disociace (z anglického „collision-induced dissociation“)
CIU	kolizně indukované rozbalení proteinů (z anglického „collision-induced unfolding“)
Cyt C	cytochrom C
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem (z anglického „electrospray ionization“)
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina (z anglického „2-deoxyribonucleic acid“)
DBD	DNA vazebná doména (z anglického „DNA binding domain“)
dsDNA	dvouvláknová DNA (z anglického „double-stranded DNA“)
GC	plynová chromatografie (z anglického „gas chromatography“)
HLH	rodina transkripčních faktorů majících motiv helix-smyčka-helix (z anglického „helix-loop-helix“)
HEPES	(4-(2-hydroxyethylamino)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina
IM	iontová mobilita (z anglického „ion mobility“), pro samostatně stojící instrument užívána zkratka:
IMS	iontová mobilitní spektrometrie (z anglického „ion mobility spectrometry“)
IM-MS	iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z anglického „ion mobility mass spectrometry“), někdy též nazývána jako pohyblivost iontů, v této práci výlučně uváděno jako iontová mobilita.
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	médium pro kultivaci bakterií (z anglického „Luria-Bertani broth“)
LC	kapalinová chromatografie (z anglického „liquid chromatography“)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (z anglického „matrix-assisted laser desorption/ionization“)
MAP4K	MAP kinasa kinasa kinasa kinasa (z anglického „Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase“)



mRNA	mediátorová RNA (též užíván anglický název „messenger RNA“)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického „mass spectrometry“)
MWCO	limit molekulové hmotnosti (z anglického „molecular weight cut-off“)
M-CAT	vazná sekvence transkripčních faktorů TEAD (z anglického „muscle-CAT“), někdy též užíváno pouze jako MCAT
$m/z$	poměr hmotnosti ku náboji (veličina určovaná při MS analýze), někdy taktéž užívána zkratka $m/q$
nESI	ionizace nanoelektrosprejem
NMR	nukleární magnetická rezonance (z anglického „nuclear magnetic resonance“)
OD	optická denzita
PRR	oblast proteinu bohatá na prolin (z anglického „proline rich region“)
RNA	ribonukleová kyselina (z anglického „ribonucleic acid“)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (z anglického „SDS-polyacrylamide gel electrophoresis“)
ssDNA	jednovláknová DNA (z anglického „single stranded DNA“)
TAZ	aktivátor proteinu TEAD (z anglického „transcriptional coactivator with PDZ-binding motif“), také známý jako WWTR1 (z anglického „WW-domain containing transcription regulator 1“)
TBE	Tris-borát-EDTA, použito ve spojení TBE pufr
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAD	rodina transkripčních faktorů, jež je součástí Hippo dráhy (z anglického „Transcriptional enhanced associate domain“)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
TOF	analyzátor doby letu hmotnostního spektrometru (z anglického „time-of-flight“)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBQ	ubiquitin
VGLL2	represor transkripce, vážící se na TEAD (z anglického „vestigial-like protein 4“), někdy též značen VGlI2
YAP	aktivátor proteinu TEAD (z anglického „yes-associated protein“)
YBD	YAP vazebná doména proteinů TEAD (z anglického „YAP binding domain“)
ZNF	zinkový prst (z anglického „zinc finger“)

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Transkripční faktory a regulace genové exprese

Transkripční faktory (TF) tvoří skupinu proteinů, které jsou schopny vázat se na DNA. Tato interakce následně ovlivňuje transkripci, tedy přepis z DNA do mRNA a potažmo expresi daných genů. Transkripční faktory jsou důležitou součástí mechanismů, které se přímo podílí na interpretaci informace, jež je zakódovaná v DNA. Díky tomu jsou TF pro organismy nepostradatelnými proteiny, které se spolupodílí na fungování a kontrole mnohých buněčných procesů, jako např. řízení buněčného cyklu, udržování metabolické rovnováhy nebo diferenciaci buněk. Jsou také součástí mechanismů, které umožňují buňkám reagovat na vnější i vnitřní stimuly. U člověka je odhadováno, že skupina transkripčních faktorů čítá asi 1600 proteinů. [1], [2].

Transkripční aktivace je komplikovaným procesem zahrnujícím několik částí. V první fázi musí dojít k rozvolnění struktury chromatinu. Poté dochází k sestavení preiniciačního komplexu a až následně může dojít k vlastní transkripci. Takto složitý proces vyžaduje pro svou funkci velkou škálu proteinů, mezi které patří i TF [3].

Jak již bylo zmíněno výše, transkripční faktory jsou pro organismy důležité, jejich nesprávná funkce v řízení genové exprese tak může vést ke vzniku chorob, kterými jsou například vývojové poruchy jako hypodontie [4] či onkologická onemocnění [1]. Spojitost TF s onkologickými onemocněními byla ověřována porovnáním genetické informace zdravých a nádorových buněk. U nádorových buněk byl oproti zdravým lidským buňkám zaznamenán nárůst genové exprese u transkripčních faktorů a proteinů spojených s transkripční regulací [5].

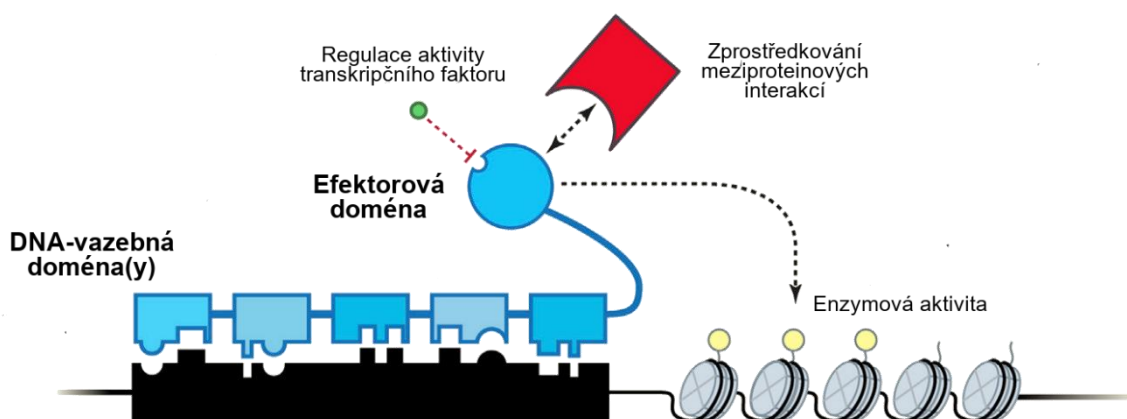
### 1.1.1 Struktura transkripčních faktorů

Do skupiny transkripčních faktorů jsou historicky řazeny proteiny mající část schopnou interakce se specifickou částí DNA, další část TF je pak odpovědná za regulaci transkripční aktivity. Funkce těchto proteinů je tudíž pevně spjata s jejich strukturou. Běžné transkripční faktory mají doménovou strukturu, která je znázorněna na *Obr. 1 na str. 11* [2].

Interakci proteinu s DNA zajišťuje DNA-vazebná doména, která se v závislosti na konkrétním TF obvykle váže na sekvenci 6–12 nukleotidů ve struktuře DNA. Pro lidské transkripční faktory je typická možnost vazby jednoho TF na více míst v genomu a kooperativní vazba několika TF (např. u proteinů TEAD [6]). Většina transkripčních

faktorů má více DNA-vazných domén, což je též znázorněno na *Obr. 1* [2], [7]. Při vazbě transkripčního faktoru na DNA dochází povětšinou k interakci mezi DNA-vazebnou doménou proteinu a velkým žlábkem DNA. Přesto existují i příklady, kdy je vazba uskutečněna díky interakcím s malým žlábkem či cukrfosfátovou kostrou [8].

Další částí TF je efektorová doména (někdy též nazývána jako aktivační [9]), která může mít více funkcí v závislosti na konkrétním proteinu. Důležitou roli hrají efektorové domény při iniciaci transkripce. Pomocí interakce s koaktivátory či s bazálními TF (např. TATA vazebný protein, či TFIIA) dochází k stimulaci transkripční aktivity. Další typ efektorových domén odpovídá za kooperativní vazbu s jinými TF a tvorbu hetero- či homodimerů. Poslední typ efektorových domén je schopný interagovat s chromatin modifikujícími enzymy, histon methyltransferasami či histon acetyltransferasami, a ovlivňovat tak dostupnost jednotlivých genů [3].

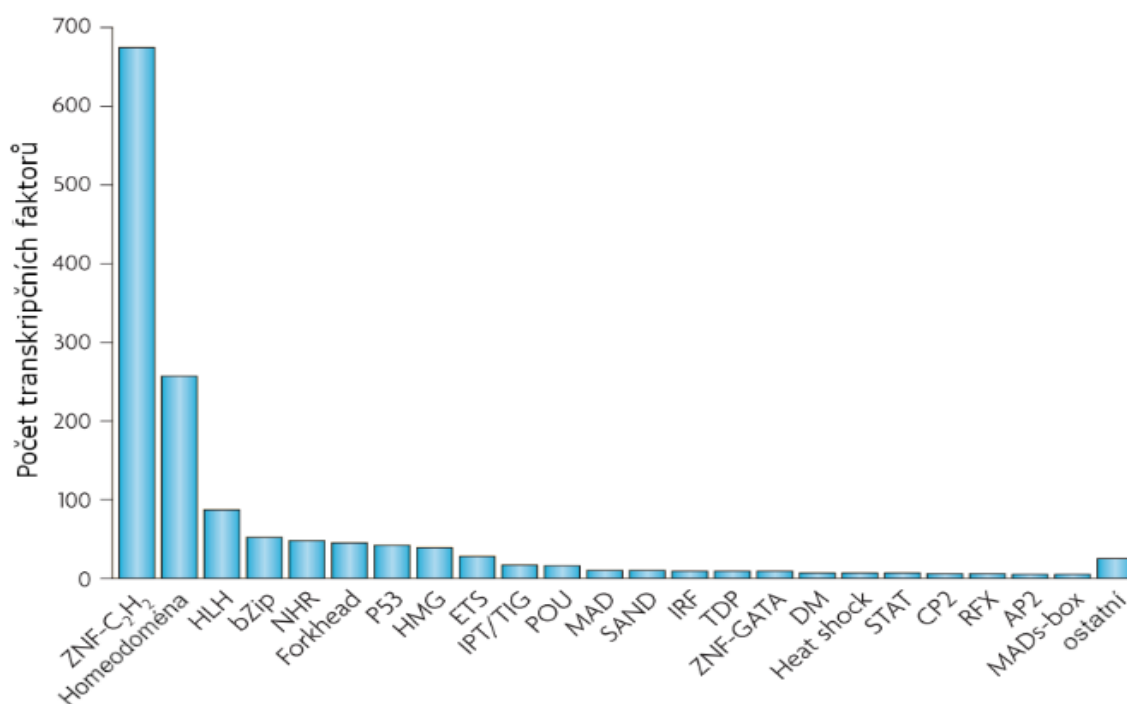


**Obrázek 1** Schématické znázornění struktury transkripčního faktoru (modře). Černá struktura znázorňuje dsDNA, kde jsou vyobrazena specifická vazebná místa pro daný TF. Převzato z [2], upraveno.

### 1.1.1.1 Klasifikace transkripčních faktorů a jejich rodiny

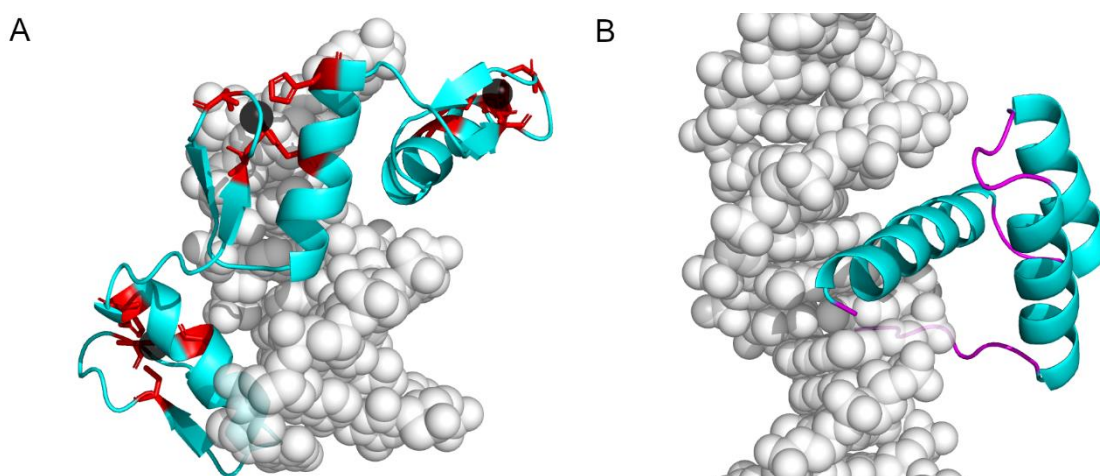
Struktury DNA-vazebné domény nejen u lidských transkripčních faktorů jsou značně konzervované, což nabízí jejich dělení do podskupin, tzv. rodin dle tvaru funkční domény, která zodpovídá za vazbu na DNA. Historie výzkumu interakce transkripčních faktorů s DNA sahá do 80. let minulého století, kdy byly popsány základní rodiny TF, zinkový prst ( $C_2H_2$ -ZNF), homeodoména, helix-smyčka-helix (HLH) a leucinový zip (bZip). Do těchto čtyřech skupin můžeme zařadit více než 80 % lidských transkripčních faktorů, jak je patrné z grafu v Obr. 2 [2], [10]. Je známo, že většina TF obsahuje více než jednu DBD, avšak pouze v malém množství z nich (zhruba 3 %) jsou zastoupeny DNA-vazné domény z více rodin [2].

Dle grafu v Obr. 2 jsou nejčastěji zastoupenými TF ty mající DNA-vazebnou doménu z rodiny  $C_2H_2$ -ZNF zinkového prstu. Tato skupina získala své označení  $C_2H_2$ -ZNF jako zkratku  $Cys_2His_2$ -ZNF, kdy jsou ionty zinku koordinovány právě těmito aminokyselinami, zvýrazněno v Obr. 3 na str. 13. Tyto TF obsahují konzervovanou strukturu dvouvláknového antiparalelního beta-skládaného listu a alfa-helixu, která bývá označována jako  $\beta\beta\alpha$  doména. K vazbě na DNA u této rodiny TF dochází díky interakci zbytků aminokyselin na povrchu alfa-helixu s bázemi velkého žlábků dsDNA [11], [12], [13].



**Obrázek 2** Graf znázorňující počet známých členů jednotlivých rodin transkripčních faktorů. Převzato z [1], upraveno.

Druhou nejčastější rodinou DNA-vazebných domén transkripčních faktorů je homeodoména. Ta získala svůj název podle rodiny homeobox genů, které hrají důležitou roli pro vývoj organismů. Homeobox gen kóduje šedesátiaminokyselinový peptid, který je nazýván homeodoménou. Jelikož se proteiny, jenž obsahují homeodoménu, vyskytují nejen u živočichů, ale i u hub a rostlin, předpokládá se, že vznikly nedlouho po evoluci prvních eukaryot. Strukturně se homeodoména skládá ze tří alfa-helixů spojených smyčkami, které dohromady tvoří těsné globulární uspořádání. Od N-konce homeodomény jsou jednotlivé helixy očíslovány od I do III. Helix II a III tvoří strukturu, která je ztotožnitelná s TF z rodiny HLH. Mezi transkripční faktory, které obsahují tuto strukturu, patří například proteiny TEAD [14], [15].



**Obrázek 3** Zobrazení interakce DNA vazebných domén transkripčních faktorů s dsDNA.

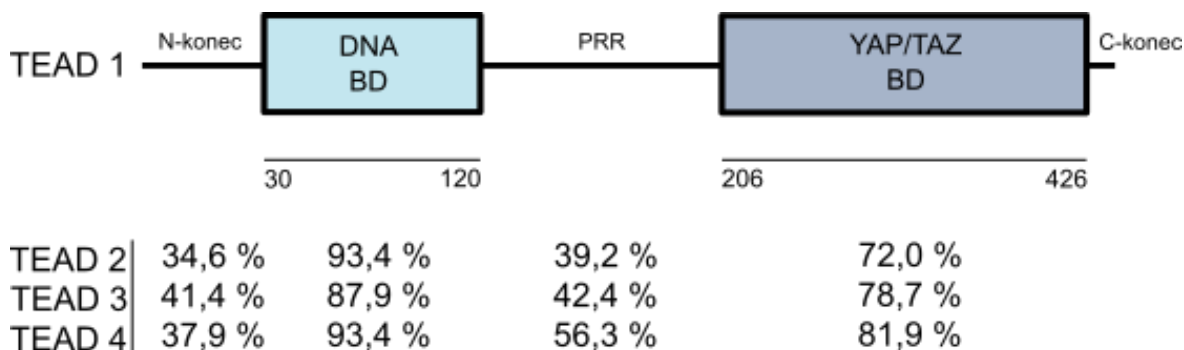
**A** TF z rodiny zinkových prstů  $C_2H_2$  ZNF, myši Zif268 protein, PDB kód 1ZAA [13]. Ionty zinku zobrazeny černou barvou, cysteiny a histidiny zapojené do koordinace zinku jsou zobrazeny jako tyčinky a barevně odlišeny.

**B** homeodoména u drosophilly, PDB kód 1HDD [14]. U proteinu jsou barevně rozlišeny sekundární struktury: alfa-helix sv. modře, smyčky fialově.

### 1.1.2 TEAD rodina transkripčních faktorů

Proteiny z rodiny TEAD jsou transkripční faktory, které jsou nezbytné pro Hippo dráhu a hrají důležitou roli při proliferaci a apoptóze. Právě z toho důvodu má každý organismus alespoň jednu ze čtyř forem proteinu TEAD1-4, které bývají označovány též jako TEF-1, TEF-3, TEF-4 a TEF-5. Všechny TEAD proteiny mají doménové složení, které je znázorněno na Obr. 4 na str. 14, sestávají se z DNA vazné a efektorové YAP (yes-associated protein) domény. DNA-vazebné domény jsou konzervované a jsou označovány zkratkou TEA. Efektorová doména proteinů TEAD slouží k vazbě aktivátorů transkripčního faktoru,

proteinů YAP či TAZ. Jak je patrné z *Obr. 4*, aktivační doména těchto proteinů je méně konzervovaná než DBD [6].



**Obrázek 4** Grafické znázornění primární struktury proteinu TEAD 1 a porovnání jeho sekvenční identity s proteiny TEAD 2, 3 a 4. Zkratka PRR značí oblast bohatou na prolin, která spojuje DNA-vazebnou doménu a efektorovou doménu proteinu. Čísla pod grafikou označují pořadí aminokyselin od N-konce proteinu. Hodnoty uvedeny pro lidské TEAD 1-4. Data převzata z [6].

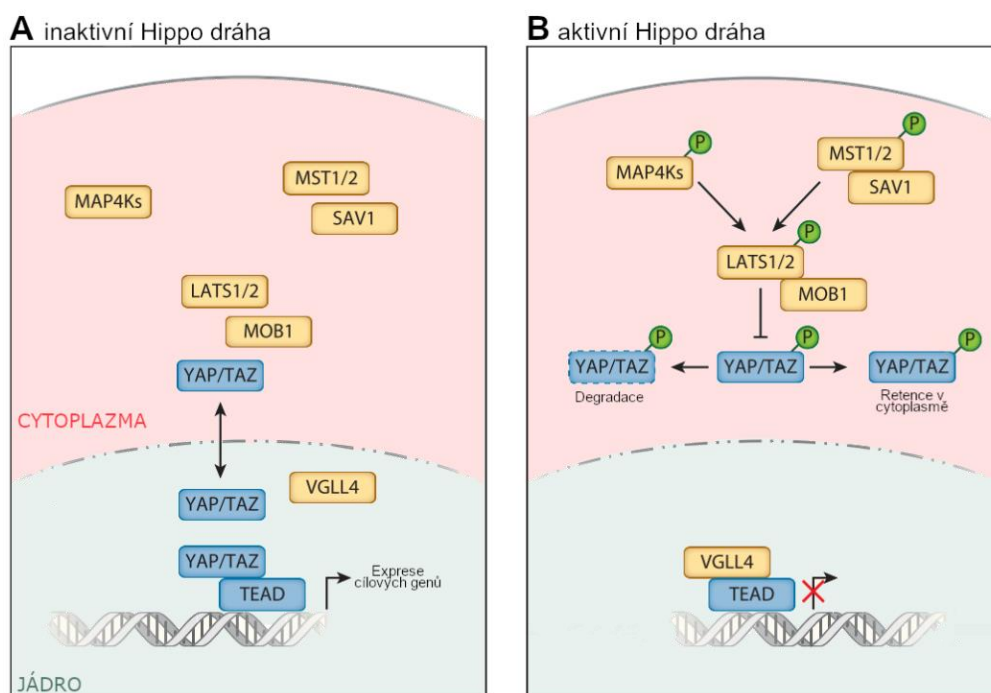
Proteiny z rodiny TEAD jsou cílovými efekty Hippo signální dráhy, která je u savců evolučně konzervovanou kinasovou kaskádou. Ovlivňuje například buněčný růst a své jméno získala dle mutantů, kteří neměli protein Hippo (Hpo) a docházelo u nich k enormnímu růstu orgánů, což připomínalo hrocha (anglicky „hippopotamus“). K regulaci této dráhy dochází na základě vnitřních či vnějších stimulů, kterými jsou např. buněčný kontakt, mechanické podněty či stres. Hippo signální dráha může být též ovlivněna hormonálními faktory, kdy je přenos signálu obvykle zprostředkován receptory svázanými s G-proteiny [16].

Cílovými transkripčními koregulátory Hippo signální dráhy jsou proteiny YAP a TAZ, které však nemají vlastní DNA-vazebné domény, proto u nich dochází pouze k vazbě na efektorovou doménu transkripčních faktorů z rodiny TEAD, jak je znázorněno na *Obr. 5 na str. 15* [16].

#### 1.1.2.1 Regulační doména proteinů TEAD (TEAD YBD)

Regulační doména proteinu TEAD (TEAD YBD) má strukturu beta-sandwiche se čtyřmi alfa-helixy. Jak již bylo naznačeno výše, funkcí této domény je vazba transkripčních aktivátorů YAP a TAZ či represoru VGLL4, odkud také získala svůj anglický název „YAP binding domain“ a zkratku YBD [6].

U TEAD YBD dochází k posttranslační S-palmitoylaci na cysteinu, který je konzervovaný napříč všemi zástupci proteinové rodiny. I díky této modifikaci vzniká uprostřed beta-sandwichové struktury hydrofobní kavita, jež slouží ke strukturní stabilizaci proteinu. Předpokládá se, že by palmitoylace mohla sloužit jako regulační krok při syntéze proteinu či napomáhat při kontrole transkripce. Žádná z těchto hypotéz však nebyla potvrzena a další funkce této posttranslační modifikace zůstávají doposud nejasné [16], [17].



**Obrázek 5** Schéma **A** inaktivní a **B** aktivní Hippo signální dráhy.

**A** Je-li Hippo dráha inaktivní, nejsou proteiny YAP/TAZ fosforylovány a může tak docházet k jejich přesunu do buněčného jádra a k vazbě na TEAD, jež následně spouští genovou expresi.

**B** V případě aktivace Hippo dráhy je spuštěna kinázová kaskáda, která je zakončena fosforylací YAP/TAZ. Ty jsou následně degradovány nebo skladovány v cytoplasmě a nepřechází do jádra buňky. Na TEAD se v jádře váže represor VGLL4, který zabraňuje genové expresi (znázorněné zkratky proteinu popsány v seznamu zkratk). Převzato z [16], upraveno.

### 1.1.2.2 TEA doména (DNA vazebná doména proteinů TEAD)

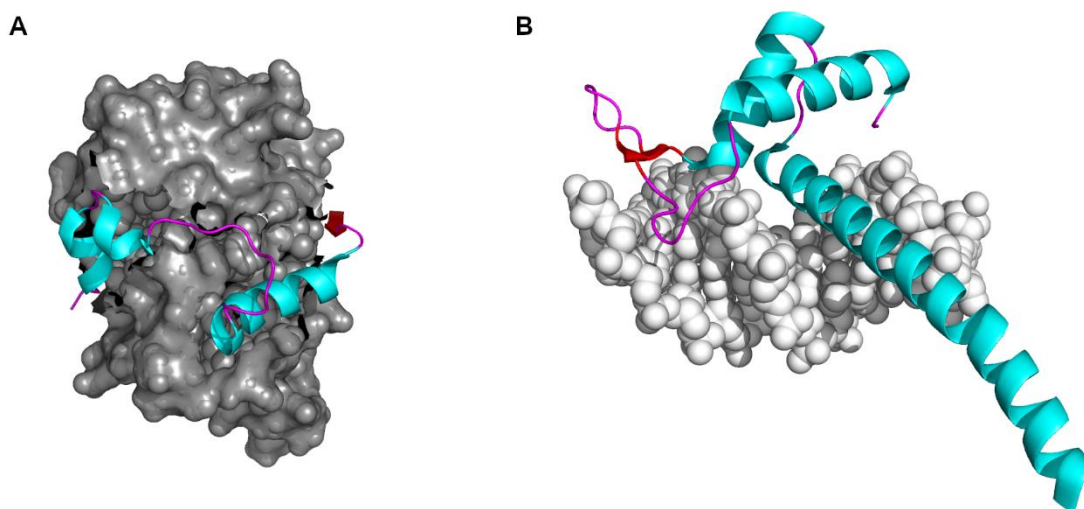
DNA-vazebná doména proteinů TEAD je vysoce konzervovanou strukturou, která bývá označovaná též jako TEA doména. Je složena ze tří alfa-helixů, číslovaných od N-konce H1-3 proteinu, uspořádaných do struktury homeodomény. Patří tak dle grafu na *Obr. 2 na str. 12* mezi druhou nejčtetnější skupinu DBD u transkripčních faktorů. Strukturu TEAD4-DBD naleznete na *Obr. 6 B na str. 16* [18].

Vazebné domény proteinů TEAD interagují s dsDNA, která je v nejběžnější B-formě. Vazebné sekvence dsDNA pro proteiny TEAD se mimo jiné vyskytují v promotorových



oblastech genů, které ovlivňují tvorbu kosterní, hladké i srdeční svaloviny [19]. Proto se nazývají muscle-CAT elementy (M-CAT), kde zkratka CAT značí nukleové báze cytosin-adenin-thymin, které se jako první vyskytují ve vazné sekvenci 5'-CATTCCT-3'. Afinitu proteinů TEAD 1-4 k M-CAT elementu popisuje disociační konstanta  $K_d$ , která nabývá řádově nanomolárních hodnot (pro jednotlivé proteiny z rodiny TEAD a M-CAT rozmezí 16-38 nM) [6].

Při vazbě TEA domény na DNA dochází k interakci helixu H3 s jejím velkým žlábkem. Helixy H1 a H2 přispívají ke vzniku interakce H3 helixu s duplexem a na jejich styku dochází ke vzniku hydrofobního místa, které strukturu stabilizuje. K interakci s velkým žlábkem DNA dochází díky vzniku vodíkových můstků mezi aminokyselinami Asn, Glu a Arg, lokalizovaných na H2 a H3 alfa-helixu, a fosfáty z kostry DNA. Interakce s malým žlábkem DNA duplexu způsobuje na smyčce L1 (spojující helixy H1 a H2) vznik antiparalelního beta-skládaného listu, který se na nevázané DNA-vazebné doméně proteinu TEAD nevyskytuje [18], [19].



**Obrázek 6** *A* aktivátor YAP navázaný na lidský TEAD1 YBD. PDB kód 3KYZ [20].  
*B* vazba lidského TEAD4-DBD na M-CAT dsDNA. PDB kód 5GZB [19].

## 1.2 Hmotnostní spektrometrie a její aplikace pro studium biomolekul

Hmotnostní spektrometrie (MS) je nenahraditelnou analytickou metodou, jež nachází své uplatnění v širokém spektru vědních oborů. Základním principem této metody je separace iontů v plynné fázi na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). K této separaci dochází díky působení elektrického a/nebo magnetického pole na analyzované ionty [21], [22].

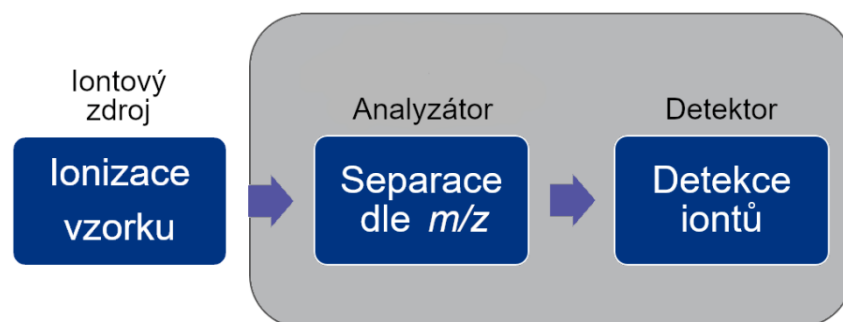


Jako první použil k měření molekulových hmotností zakřivení trajektorie pohybujících se iontů v magnetickém poli Joseph Thompson v roce 1910 [21]. V té době však hmotnostní spektrometrie sloužila pouze jako nástroj pro fyziky např. pro studium izotopů. Až ve 40. a 50. letech byla tato technika aplikována na malé organické molekuly. Rozvoj studia biomolekul pomocí MS umožnily objevy ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) učiněné v 80. letech. Schopnost analyzovat větší a méně stabilní biomolekuly (proteiny či sacharidy) byla hnacím motorem vývoje nových hmotnostně spektrometrických metod a přístupů [23], [24].

Hmotnostně spektrometrickou analýzou získáme tzv. hmotnostní spektrum, které je dvoudimenzionální reprezentací závislosti intenzity signálu na ose y na poměru  $m/z$  na ose x [22]. Hlavní výhodou této metody je její selektivita, specifita a též rychlost [21]. Nevýhodou je u některých hmotnostních spektrometrů její destruktivnost. Na rozdíl od jiných metod, které jsou užívány pro studium biomolekul např. nukleární magnetická rezonance (NMR) či infračervená (IR) nebo Ramanova spektroskopie, není možné vzorek dále analyzovat [22].

### 1.2.1 Instrumentace ve hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometr spojuje tři základní funkce: generuje ze vzorku ionty v plynné fázi, které následně separuje na základě  $m/z$ , a poté zaznamenává jejich četnost. Za tyto funkce jsou zodpovědné jednotlivé části hmotnostního spektrometru, které jsou naznačeny ve schématu na Obr. 7. Prvním z nich je iontový zdroj, který je následován analyzátozem a detektorem. Detektor, analyzátor a některé iontové zdroje pracují za sníženého tlaku,



**Obrázek 7** Schéma hmotnostního spektrometru. Šedý rámeček znázorňuje část hmotnostního spektrometru s vysokým vakuem. Jak bylo zmíněno v textu iontový zdroj, v závislosti na typu, může i nemusí být v evakuované zóně.

který dosahuje hodnot zhruba  $10^{-5}$  až  $10^{-3}$  Pa. Evakuace systému je zajištěna nejběžněji pomocí olejových a turbomolekulárních pump [21], [22].

Uvedení vzorku do hmotnostního spektrometru je možné přímou insercí, avšak předřazení separačního kroku je pro komplexní biologické vzorky běžnou praxí. Nejčastěji jsou pro separaci před MS analýzou biomolekul užívány kapalinová (LC) nebo plynová (GC) chromatografie či kapilární elektroforéza (CE) [21].

### 1.2.2 Ionizace

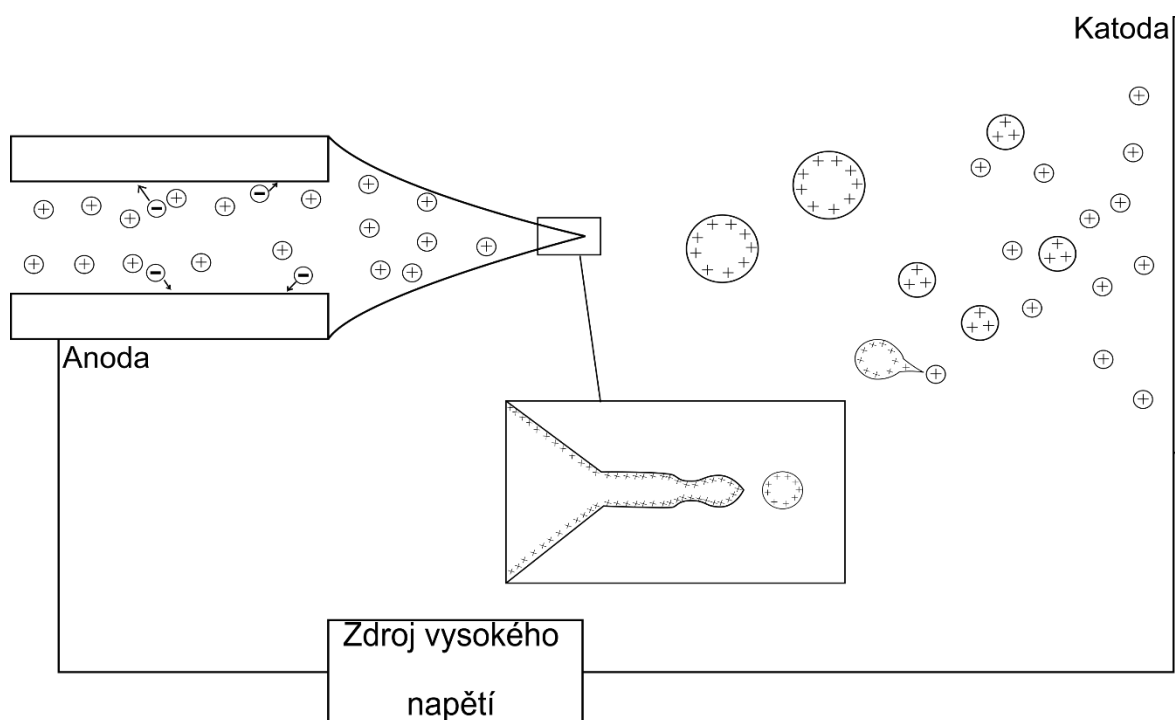
Jak již bylo zmíněno výše, hmotnostní spektrometrie umožňuje studovat molekuly, které jsou ionizovány a přítomné v plynné fázi. Pouze takové molekuly mohou být urychleny pomocí elektrického pole, vstoupit do evakuované části hmotnostního spektrometru a následně být separovány analyzátozem [21], [22].

Jednou z nejstarších užívaných ionizačních technik je elektronová ionizace (EI), která byla poprvé popsána v roce 1921 a se změnami je tato ionizace používána dodnes. Při EI je zahřáto wolframové či rheniové vlákno, čímž dochází k tvorbě elektronového paprsku, který ionizuje molekuly vzorku, které jsou již v plynné fázi. Časté je proto propojení EI s plynovou chromatografií. Nevýhodou této metody je její použitelnost převážně pro molekuly menší než 1000 Da, což značně omezuje uplatnitelnost pro studium biomolekul [21]. Schopnost analyzovat proteiny a další biologické látky pomocí hmotnostní spektrometrie byla umožněna díky rozvoji tzv. měkkých ionizačních technik, kterými jsou například ESI nebo MALDI. Měkké ionizační techniky získaly svůj název díky malé fragmentaci vzorku při tvorbě iontů v plynné fázi, která je klíčová pro úspěšnou analýzu celých biomolekul. Za objev ESI a MALDI byla v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii [21], [25].

Zkratka MALDI je užívána pro ionizaci laserem za účasti matrice. Tato metoda byla poprvé uvedena v roce 1988, a jak již bylo zmíněno výše, Kóiči Tanaka se díky ní stal laureátem Nobelovy ceny. Metoda je založena na směsné krystalizaci analyzovaného vzorku s matricí, jež absorbuje v UV nebo IR oblasti. Při ionizaci jsou krystaly ozářeny laserem za vzniku nabitých částic matrice, díky kterým dochází skrze srážky ke vzniku protonovaných molekul vzorku  $[M+H]^+$ . Mohou vznikat též více nabitě molekulové ionty, ale jejich výskyt v MALDI není tak četný. Pro různé vzorky bývají užívány různé matrice, nejčastěji jsou pro biomolekuly užívány aromatické sloučeniny, jako např. kyselina sinapová či kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. Běžně je MALDI ionizace prováděna ve vysokém

vakuu, nicméně byla vyvinuta i metoda označována AP-MALDI, která probíhá za atmosférického tlaku [21].

Ionizace elektrosprejem probíhá, na rozdíl od MALDI, přímo z kapalně fáze, proto nachází tato metoda uplatnění převážně ve spojení s předřazenou separací (LC či CE). Tato technika byla poprvé spojena s hmotnostní spektrometrií v roce 1984 a v dnešní době se jedná o nejběžnější používanou ionizační techniku. Při této ionizaci je vzorek přiveden do sprejovací kapiláry, na kterou je přiloženo napětí (cca 1-5 kV). Na konci kapiláry dochází ke vzniku tzv. Taylorova kužele, na jehož konci se odtrhávají malé kapičky rozpouštědla s ionty analytu, které jsou elektrostaticky přitahovány do vstupu hmotnostního spektrometru, na který je přiveden opačný náboj než na sprejovací kapiláru (viz *Obr. 8*) [21], [22]. Před vstupem do evakuované části hmotnostního spektrometru dochází ke zmenšování kapek v důsledku jejich desolvatace [26]. Když je překročen tzv. Rayleighův limit dochází k rozpadu kapek, jelikož coulombická repulze překonává povrchové napětí na povrchu kapky [27]. Na rozdíl od MALDI při ESI vznikají vícenásobně nabitě molekuly. Běžná ESI instrumentace zahrnuje kovovou sprejovací kapiláru, kterou protéká vzorek, v některých případech je pro lepší sprejování užít pomocný plyn [21], [22].



**Obrázek 8** Náčrt ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Na pokovenou kapiláru, jež je anodou, je přivedeno vysoké napětí (cca 1-5 kV), které způsobí vytvoření Taylorova kužele (přiblížení v rámečku). Kladně nabitě ionty jsou přitahovány katodou (vstupem do hmotnostního spektrometru). Převzato z [21], vytvořeno v programu Inkscape.

Miniaturizací běžné ESI instrumentace vznikla ionizace nanoelektrosprejem (nESI). Hlavní výhodou této metody je menší spotřeba vzorku, mezi další z jejích výhod patří také tvorba menších kapek, než je tomu u konvenční ESI. Průřez sprejovaných kapek je u běžné ESI zhruba 1-2  $\mu\text{m}$ , u nanoESI pak dosahuje méně než 200 nm, jejich objem je tudíž 100–1000krát menší [22]. Proto dochází u nanoESI k rychlejší desolvaci a k menšímu počtu rozpadů kapek [28].

Běžné sprejovací kapiláry u nanoESI dosahují průřezů 1-2  $\mu\text{m}$  a bývají zhotoveny z borosilikátového skla na speciálních trhačích kapilár. Aby bylo možné na borosilikátové kapiláry přivést napětí, jsou buď pokoveny (nejběžněji zlatem), nebo je do širších kapilár umístěno vodivé kovové vlákno. Na nanoESI kapiláru je přikládáno nižší napětí, než je tomu u konvenční ESI (i pod 1 kV), a po jeho přiložení dochází k samovolnému sprejování vzorku díky působení kapilárních sil. Díky svým výhodám je ionizace nanoelektrosprejem užívanou metodou pro nativní hmotnostní spektrometrii a rozvoj nESI s rozvojem nativní hmotnostní spektrometrie úzce souvisí [22], [29], [30].

### 1.2.3 Nativní hmotnostní spektrometrie

Nativní hmotnostní spektrometrie, označována jako nativní MS (v některé literatuře též užíván pojem nativní ionizace elektrosprejem ve spojení s hmotnostní spektrometrií [31]), je přístup k analýze biomolekul založený na ionizaci elektrosprejem, nejběžněji je však používána ionizace nanoelektrosprejem, a užití nedenedaturujícího rozpouštědla pro sprejování. Přestože podobné techniky studia biologických analytů byly známy již na konci 20. století, termín nativní MS vznikl až roku 2004. Označení nativní MS může být matoucí, obzvláště pak pro vědce mimo komunitu zabývající se hmotnostní spektrometrií, jelikož neužívá slovo nativní v jeho původním významu. Ten odkazuje na přirozené prostředí biomolekuly, tedy na její umístění v buňce. Je však patrné, že při MS analýze, která probíhá v plynné fázi, není možné takových podmínek docílit. Proto je termín nativní hmotnostní spektrometrie užíván pro popis analyzovaných molekul v roztoku před samotnou ionizací. Pro experimentátora je podstatné kontrolovat parametry, které ovlivňují strukturu biomolekul, jako pH či iontovou sílu roztoku [26].

S nativní hmotnostní spektrometrií je pevně spojeno užití ionizace elektrosprejem. Ačkoli je MALDI také měkkou ionizační technikou, hojně využívanou pro studium biomolekul, v nativní MS našla minimální uplatnění. Při směsné krystalizaci matrice se vzorkem je problematické uchovat nativní proteinové struktury, obzvláště je-li matrice

kyselá a denaturující. Běžná rozpouštědla užívaná pro MALDI matrice jsou směsi obsahující vysoký podíl organických rozpouštědel jako methanol či acetonitril. Další nevýhodou MALDI pro nativní MS je poskytnutí pouze jednou nabitých iontů, čímž se u velkých biomolekul či makromolekulárních komplexů dostáváme do hodnot  $m/z$ , které jsou často mimo hmotnostní rozsah hmotnostních spektrometrů [26].

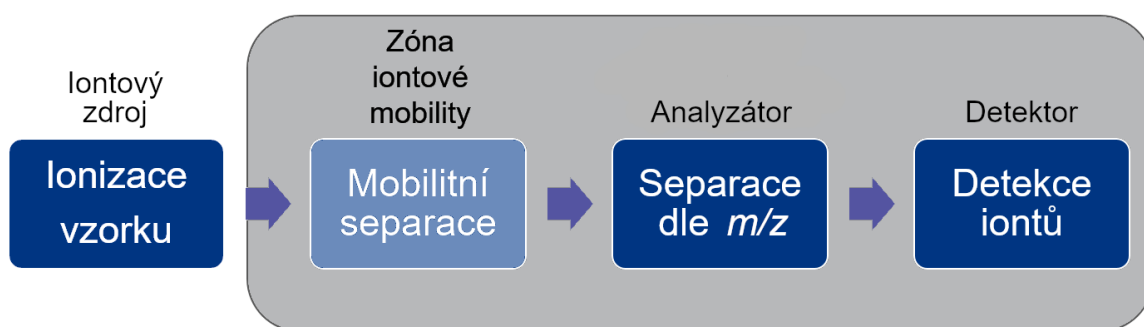
Své uplatnění nachází tento přístup MS analýzy ve strukturní biologii, kde je využíván mimo jiné i ke studiu proteinových komplexů a interakcí mezi jednotlivými biomolekulami. Ačkoli MS analýza nemůže poskytnout detailní strukturu molekul jako NMR či rentgenostrukturní analýza, její použití nabízí mnohé výhody. Hlavními přednostmi metody jsou citlivost (stačí řádově pikomolární množství analytu), rychlost, selektivita a schopnost zároveň zkoumat více složek směsi. Díky tomu byla pomocí nativní MS vyřešena stechiometrie, topologie či dynamika mnohých proteinových komplexů, mezi kterými byl např. oligomer chaperonu [32]. Uplatnění nachází nativní hmotnostní spektrometrie také ve spojení s jinými metodami, např. s iontovou mobilitou [26].

#### 1.2.4 Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Iontová mobilita, též nazývána jako iontová mobilitní spektrometrie (zkratky IMS či IM), je metoda, která je založena na separaci iontů v plynné fázi v elektrickém poli. Separace molekul funguje na principu srážek s inertním plynem, který je hnán proti analyzovaným molekulám [21]. V zóně iontové mobility dochází k dělení molekul v plynné fázi na základě poměru jejich velikosti k náboji, čímž se částečně podobá elektroforéze ve fázi kondenzované [33]. Ve spojení s MS umožňuje tudíž oddělit molekuly, které mají stejné  $m/z$ , ale jinou velikost (srážkový průřez) [34].

Podstata IMS byla objevena již na začátku 20. století, kdy fyzik Paul Langevin popsal chování iontů v elektrickém poli. Své uplatnění našla metoda později v 70. a 80. letech, kdy došlo k rozvoji IMS spojeném se snížením detekčních limitů a zlepšením selektivity [34]. Ve stejné době došlo též ke spojení s hmotnostní spektrometrií [35]. V dnešní době je pro samotnou iontově mobilitní spektrometrii, která není spojena s jinou metodou, užívána zkratka IMS. Metoda nabízí široké spektrum praktických aplikací, jako např. kontrola kvality potravin či letištní monitoring návykových látek a výbušnin [34].

Spojení iontové mobilitní spektrometrie s hmotnostní spektrometrií bývá označováno zkratkou IM-MS. Hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou má kromě základních funkcí hmotnostního spektrometru navíc schopnost iontově mobilitní separace, jinak je užívána běžná hmotnostně spektrometrická instrumentace, jak vyplývá z porovnání *Obr. 7 na str. 17* a *Obr. 9* [36]. IM-MS tedy nabízí dvoudimenzionální separaci, kdy v zóně iontové mobility dochází k dělení iontů dle poměru velikosti ku náboji a v hmotnostním analyzátoru k separaci na základě  $m/z$  [35].



**Obrázek 9** Schéma hmotnostního spektrometru s iontovou mobilitou. Šedý rámeček znázorňuje část hmotnostního spektrometru s vysokým vakuem. Jak bylo zmíněno v textu, iontový zdroj, v závislosti na typu, může i nemusí být v evakuované zóně.

#### 1.2.4.1 Instrumentace v iontové mobilitě

Stejně jako existuje více druhů instrumentace užívané v hmotnostní spektrometrii, je též používáno více druhů iontově mobilitních spektrometrů. Některé z IMS jsou užívány samostatně i ve spojení s hmotnostní spektrometrií (např. IMS v driftové trubici –DTIMS) a některé pouze ve spojení s hmotnostní spektrometrií, jako u IMS s putující vlnou – TWIMS. Každý IMS se skládá ze tří základních částí (pomineme-li uvedení vzorku do systému) – ionizačního, separačního a detekčního regionu. Jak bylo nastíněno v předchozí kapitole, schéma instrumentace hmotnostního spektrometru je velmi podobné IMS. Proto je možné u spojených instrumentů IM-MS zařadit zónu IM do schématu hmotnostního spektrometru před analyzátor bez větších změn [34]. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií jsou nejčastěji užívány dvě instrumentace DTIMS, TWIMS, které jsou dále detailněji popsány [33].

Iontová mobilitní spektrometrie v driftové trubici (DTIMS) je tradiční, nejstarší a koncepčně nejsnazší formou iontové mobilitní instrumentace, viz *Obr. 10 na str. 24* [33]. Analyzované ionty jsou přivedeny do driftové trubice, na níž je aplikováno statické,

uniformní elektrické pole (cca 5–100 V), které směřuje ionty do dalších částí instrumentu (rozumějme detektor, u IM-MS instrumentace analyzátor MS). Driftová trubice je naplněna inertním plynem (nejběžněji heliem či dusíkem) a dochází tak ke srážkám analyzovaných molekul s molekulami inertního plynu. U kompaktních struktur dochází k menšímu počtu srážek a putují tudíž trubicí rychleji než větší ionty, u kterých dojde ke zpoždění v důsledku vyššího počtu srážek [33], [34].

V trubicí dochází ke vzniku rovnováhy, kdy se analyzované ionty pohybují driftovou rychlostí  $v_d$ , jež je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$ , dle vztahu  $v_d = KE$ , kde  $K$  značí iontovou mobilitu [34]. Závislost kolizního průřezu  $\Omega$  (užívána zkratka CCS) na iontové mobilitě popisuje upravená Mason-Schampova rovnice:

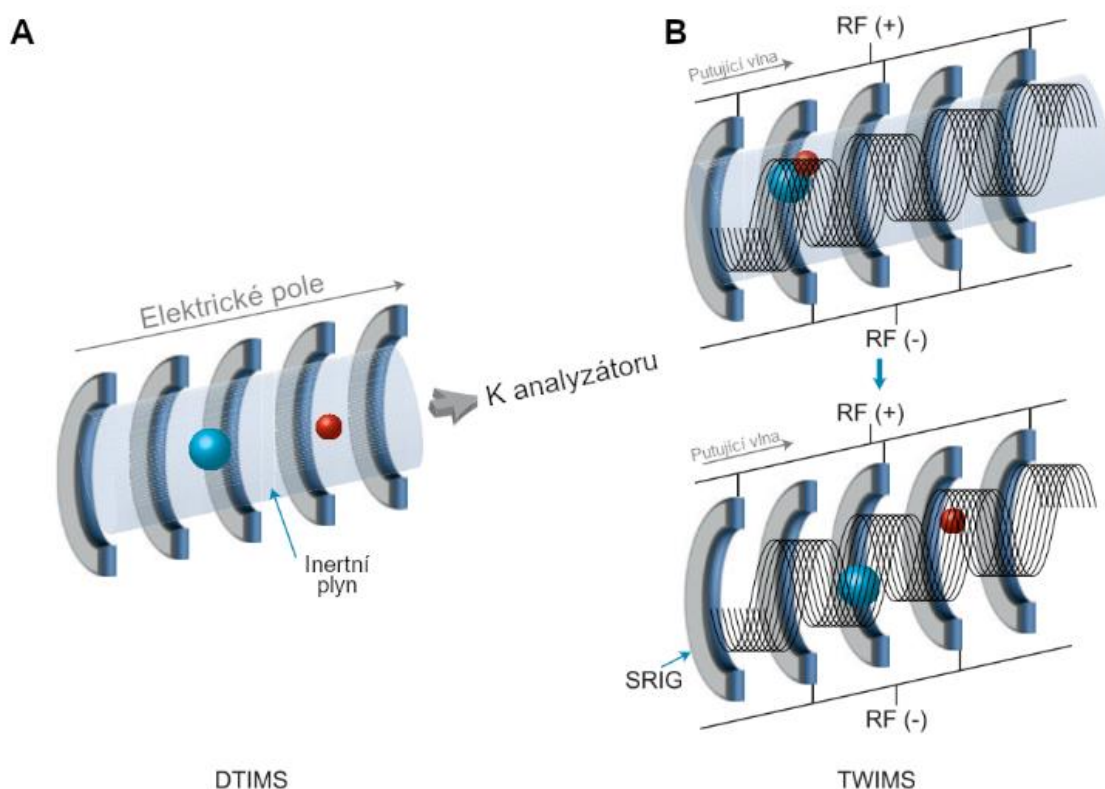
$$\Omega = \frac{3}{16} \left( \frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{ze}{NK}, \quad (1)$$

kde  $\Omega$  značí kolizní průřez,  $\mu$  redukovanou hmotnost iontu a inertního plynu v driftové trubicí,  $z$  počet elementárních nábojů zkoumaného iontu,  $e$  elementární náboj,  $k_B$  Boltzmannovu konstantu,  $T$  termodynamickou teplotu,  $N$  počet molekul v jednotkovém objemu a  $K$  iontovou mobilitu [33], [34].

U této instrumentace je možné přímo ze známých parametrů spočítat kolizní průřez dané částice. Data naměřená pomocí DTIMS je tudíž možné přímo porovnat s hodnotami zjištěnými některou z technik s vysokým rozlišením (NMR nebo rentgenostrukturní analýza) [33].

Instrumentace IMS s putující vlnou, označována zkratkou TWIMS je užívána pouze v IM-MS instrumentaci, nikoliv samostatně. Tato instrumentace se sestává z několika prstencových elektrod, které jsou nazývány SRIG (z anglického „stacked ring ion guide“), na kterých dochází změnami napětí ke vzniku putující vlny, viz *Obr. 10 na str. 14*. Na jednotlivé elektrody je střídavě aplikována opačná fáze radiofrekvenčního napětí (RF), čímž dochází k radiální separaci iontů. Aby docházelo k axiálnímu přenosu iontů instrumentem, jsou též vkládány pulsy stejnosměrného proudu, které ionty unášejí směrem k hmotnostnímu analyzátoru. Stejně jako u DTIMS je IM naplněna inertním plynem. Dochází tak ke srážkám analyzovaných molekul s tímto plynem a zpoždování větších iontů, jak bylo popsáno výše. Separované molekuly se též dělí díky vzniklé napěťové vlně, kdy jsou větší molekuly zpoždovány oproti menším [33], [34].

Na rozdíl od DTIMS nelze u TWIMS aplikovat Masson-Schampovu rovnici (1) pro přímý výpočet CCS, jelikož je elektrické pole při TWIMS proměnné. Pro určení CCS pomocí TWIMS je tudíž nutné provést kalibraci vzorkem se známým CCS, jež má podobné fyzikální i chemické vlastnosti jako analyzovaná látka. Je též nutné provádět kalibraci při stejném nastavení TWIMS jako při vlastním měření, aby byla kalibrace platná [34], [37], [38]. Další možností interpretace získaných výsledků, která nevyžaduje kalibraci a je užívána v některých publikacích, je komparativní použití časů „drift time“, které jsou přímo úměrné velikosti dané molekuly a jsou získány přímo z měření IM [33].



**Obrázek 10** Porovnání instrumentací užívaných pro IMS. Molekula s menším kolizním průřezem znázorněna červeně, s větším modře.

**A** DTIMS - iontová mobilita s driftovou trubicí

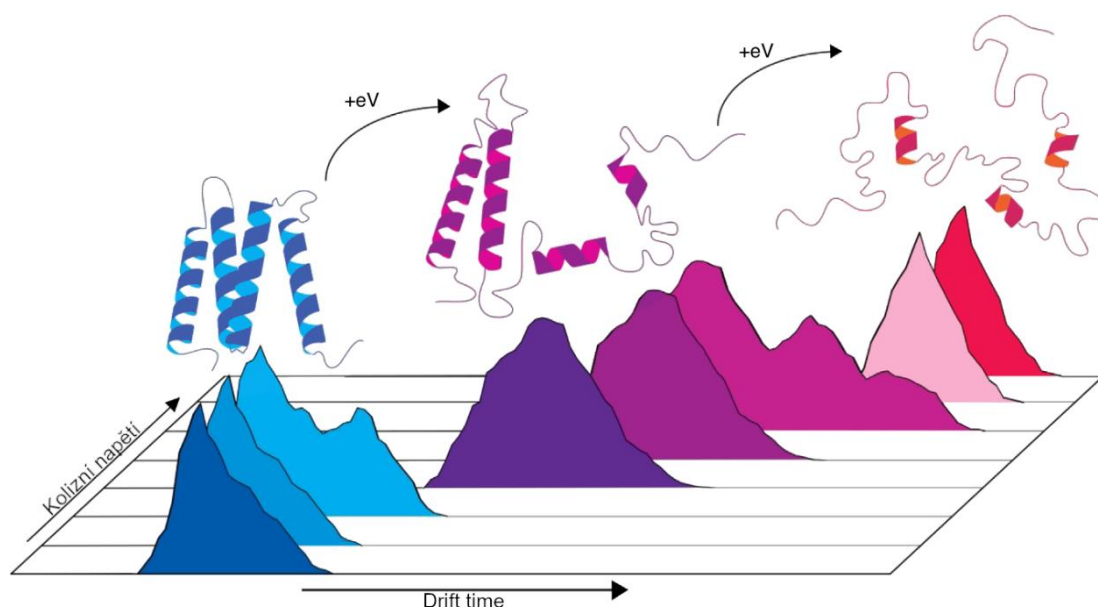
**B** TWIMS iontová mobilita s putující vlnou. Zkratka RF značí radiofrekvenční napětí, značky (+) a (-) opačné fáze RF. Na obrázcích pod sebou je naznačen průchod iontů instrumentem. Černá vlnovka naznačuje vzniklé napěťové vlny. Převzato z [33], upraveno.



#### 1.2.4.2 Aktivace a iontová mobilita ve spojení s MS

Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií je v současnosti rozvíjející se metodou pro strukturní charakterizaci proteinů či proteinových komplexů. Jednou z možností, jak studovat biomolekuly pomocí IM-MS, je užití kolizních aktivací [39]. Při kolizní aktivaci (označována zkratkou CIU z anglického „collision induced unfolding“) jsou analyzované proteiny aktivovány srážkami s inertním plynem, např. heliem, dusíkem či argonem [22]. Dochází tak ke zvýšení vnitřní energie, což je doprovázeno změnou konformace molekul v plynné fázi. IM-MS instrumentace nám umožňuje sledovat rozbalování proteinů pomocí změn v naměřených „drift time“ či CCS, jak je schematicky znázorněno na Obr. 11 [39].

První pozorování CIU byla provedena na cytochromu C a apomyoglobinu. Dnes nachází CIU své uplatnění ve studiu stability proteinů a protein–ligandových komplexů. Běžně jsou experimenty prováděny postupným zvyšováním energie srážek s inertním plynem, ke kterým dochází před zónou iontové mobility. Díky spojení s MS instrumentací je možné sledovat rozbalování zkoumané biomolekuly bez pozorování jejích fragmentů vzniklých kolizně indukovanou disociací (CID) [39].



**Obrázek 11** Schématické znázornění průběhu kolizní aktivace při IM-MS experimentu. S postupným zvyšováním kolizní energie dochází k rozbalování proteinů. To je pozorováno díky zvyšování naměřených „drift time“ (CCS) Převzato z [39], upraveno.

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Rekombinantní exprese a purifikace proteinu TEAD1-DBD
2. Ověření schopnosti proteinu TEAD1-DBD vázat dsDNA
3. Studium proteinu TEAD1-DBD a jeho komplexů s dvouvláknovou DNA pomocí hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1 Použité chemikálie

Agar	Oxoid, USA
Akrylamid (99,5 %)	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný (p. a. kvalita)	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř (ACS kvalita)	Serva, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250 (65%, ultrapure)	VWR International, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED) (99%, GC)	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	Bio-Rad, USA
Ethanol (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
(HPLC kvalita)	Lach-Ner, ČR
Barva pro specifické barvení nukleových kyselin	
GelRed	Biotium, USA
(4-(2-hydroxyethylamino)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina (HEPES) (99,5 %)	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
Chloramfenikol	Jersey Lab Supply, USA
Chlorid sodný (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
Imidazol (p. a. kvalita)	Fluka, Švýcarsko
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (98 %)	VWR International, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	VWR International, USA
Kyselina chlorovodíková (37%, ASC kvalita)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová (99,7 %, ACS kvalita)	Fluka, Švýcarsko
2-merkaptoethanol (HPLC kvalita, 99 %)	Sigma-Aldrich, USA
<i>N,N</i> -methylen-bis-akrylamid (99 %)	Sigma-Aldrich, USA
Octan amonný (LC-MS kvalita)	Sigma-Aldrich, USA
Peroxodisírán amonný (ACS kvalita)	Sigma-Aldrich, USA
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, USA
Talon Superflow Metal Affinity Resin	Bio-Rad, USA

Thrombin (lidská plazma, 2800 NIH units/mg proteinu)	EMD Millipore Corp, USA
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) (98 %)	Sigma-Aldrich, USA
Tris (99,8%)	Bio-Rad, USA
Trypton	Oxoid, USA
Voda (deionizovaná, LC-MS kvalita)	Merck, Německo
Yeast extrakt (extrakt z kvasnic)	Oxoid, USA

### 3.1.1 Roztoky (pufry a média)

- Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)  
70 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) *N,N*-methylen-bisakrylamid
- Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely  
45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- Ekvilibrační pufr pro afinitní chromatografii  
25mmol/l dihydrogenfosforečnan draselný, 1mmol/l 2-merkaptoethanol, 0,5mol/l chlorid sodný, pH 7,0, filtrováno
- Eluční pufr pro afinitní chromatografii  
Ekvilibrační pufr s přidavkem 0,5mol/l imidazolu, pH 7,0, přefiltrováno
- HEPES pufr pro gelovou chromatografii  
20mmol/l HEPES, 150mmol/l NaCl, 1mmol/l TCEP, pH 7,0, přefiltrováno
- LB médium  
1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic (yeast extrakt), 1% (w/v) NaCl, pH 7,4, sterilizováno
- LB médium s agarem (LB agar)  
LB médium s 1,25 % (w/v) agaru, sterilizováno
- Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE  
55 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- Promývací pufr pro afinitní chromatografii  
Ekvilibrační pufr, 30mmol/l imidazol, pH 7,0, filtrováno
- TBE pufr 10× koncentrovaný  
0,89mol/l Tris, 0,89mol/l kyselina boritá, 0,02mol/l EDTA, pH 8,3
- Tris-Glycin SDS pufr  
Komerční výrobek firmy Bio-Rad, USA
- Vzorkový pufr pro nativní gelovou elektroforézu  
10mmol/l Tris, 0,03 % (w/v) bromfenolová modř, 60 % (v/v) glycerol, 60mmol/l EDTA, pH 7,6

### 3.1.2 Užití bakteriální kmeny

*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Stratagene, USA  
Genotyp: F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*(rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* λ(DE3)  
*endA* Hte [*argU proL* Cam<sup>r</sup>][*argU ileY leuW* Strep/Spec<sup>r</sup>]

### 3.1.3 Vektory a oligonukleotidy

pET-28a(+)-TEAD1-DBD Generey, Čína  
*C-MYC* enhancer-f IDT, USA  
5'-GCAATCCTTAAAGCT-3'  
*C-MYC* enhancer-r IDT, USA  
5'-AGCTTTAAGGATTGC-3'  
*C-MYC* exon-f IDT, USA  
5'-GTAGTAATTCCAGCG-3'  
*C-MYC* exon-r IDT, USA  
5'-CGCTGGAATTACTAC-3'

## 3.2 Použité přístroje a materiál

Analytické váhy AL54-IC Mettler Toledo, Švýcarsko  
Automatické pipety (a příslušné pipetovací špičky) Gilson, USA  
Thermo Scientific, USA  
Centrifuga 5920R, výměnné rotory Eppendorf, Německo  
Výkyvný rotor S-4x1000  
Centrifuga (stolní) UNIVERSAL 320 Hettich, Německo  
Úhlový rotor MIKRO 185  
Centrifuga (ultracentrifuga) Avanti J-26 XP, výměnné rotory Beckman Coulter, USA  
Úhlový rotor JA-25.50  
Úhlový rotor JLA-9.1000  
Centrifugační koncentrátoři Millipore, USA  
Amicon® Ultra 15mL (15 ml, 3000 MWCO)  
Amicon® Ultra 4mL (4ml, 3000 MWCO)

Centrifugační kyvety	Beckman Coulter, USA
1 l, J-lite, PP	
50 ml, se šroubovacím uzávěrem, PP	
Centrifugační zkumavky (50 ml, 15 ml)	Corning, USA
Fotodokumentační box	Bio-Rad, USA
ChemiDoc MP Universal Hood III	
Dialyzační trubice	Spectrum Laboratories, USA
Držák nESI emitterů	Zhotoven v laboratoři technikou 3D tisku
	ESCO, Singapur
Hlubokomrazicí box Lexicon II	
Hmotnostní spektrometr s iontovou mobilitou	
Synapt G2 Si	Waters, USA
Chladnička s mrazničkou	Samsung, Jižní Korea
Inkubátor Incucell	BMT, ČR
Chromatografický systém NGC Quest 10	Bio-Rad, USA
Kapiláry z křemenného skla Q100-70-7.5	Sutter Instrument, USA
Kolona ENrich SEC 70 10 x 300 mm	Bio-Rad, USA
Ledovač Powericer XL	Klarstein, Německo
Magnetická míchačka C-MAG HS 10 digital	Ika, Německo
Membránové filtry (0,45 µm)	Merck, Německo
Mikrostříkačka (1000 µl)	Hamilton, USA
nESI emitery	Připraveny Mgr. Janem Fialou
Odsolovací kolonky	
Micro Bio-spin® P-6	Biorad, USA
pH elektroda InLab Expert	Mettler Toledo, Švýcarsko
pH metr Orion Star A111	Thermo Scientific, USA
Předvážky HF 1200G	AND, USA
Peristaltická pumpa Econo gradient pump	Bio-Rad, USA
Pipetovací špičky pro nanášení na gel	
0,5-20 µL GELoader	Eppendorf, Německo
Sonikační sonda Ultrasonic Homogeniser 4710	Cole-Pharmer, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA

Spektrofotometr DeNovix DS-11 FX+	DeNovix, USA
Stolní minicentrifuga mini spin	Eppendorf, Německo
Termostat s třepačkou Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Třepačka Multitron Pro	Infors, Švýcarsko
Trhač kapilár P-2000	Sutter Instrument, USA
Vortex	Scientifica, Itálie
Zdroj napětí MP-250V	Cleaver Scientific, UK

### 3.2.1 Použité softwarové nástroje

Pro tvorbu grafů, teplotních map, hmotnostních spekter a matematické zpracování dat:

- OriginPro 2015
- Microsoft Excel 2013

Pro analýzu hmotnostních spekter a IM-MS stopy:

- Waters MassLynx V4.1

Pro grafické zpracování obrázků a příloh:

- INKSCAPE 0.92.4
- GIMP 2.10.02

Pro editaci textu:

- Microsoft Word 365 ProPlus

Pro práci se sekvencí proteinu:

- GPMW 8.0

Pro vizualizaci molekul:

- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

## 3.3 Použité metody

### 3.3.1 Rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD

Optimalizace rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD nebyla předmětem této bakalářské práce. Produkce proteinu byla provedena dle již známého protokolu, běžně používaného v naší laboratoři [40].

#### 3.3.1.1 *Transformace buněk*

Pro transformaci buněk BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL plasmidem pET-28(+)-TEAD1-DBD byla užitá metoda teplotního šoku. Plasmid obsahoval gen pro DNA vazebnou

doménou proteinu TEAD1, vloženou mezi restrikční sekvenční pro endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*. Dále byla v sekvenci plasmidu vložena histidinová kotva, která byla od sekvenční TEAD1-DBD oddělena štěpným místem pro thrombin a *lac* operon. Plasmid též obsahoval selekční znaky, rezistenci na antibiotika kanamycin a chloramfenikol.

Kompetentní buňky, které byly dlouhodobě skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , byly rozmrazeny na ledu, a k  $100\text{ }\mu\text{l}$  bakteriální suspenze bylo přidáno  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  plasmidu o koncentraci  $0,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Spolu se vzorkem byla též připravena negativní kontrola buněk, ke které nebyl přidán plasmid. Vzorky byly 20 minut inkubovány na ledu a následně byl v termostatu při teplotě  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  proveden teplotní šok po dobu 45 s. Poté byly buňky opět vráceny na led a byl přidán 1 ml sterilního LB média. Následně byly vzorky inkubovány 1 h v termostatu s třepačkou při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $550\text{ ot/min}$ .

Po uplynutí 1 hodiny byly vzorky centrifugovány na stolní minicentrifuze (5 minut,  $1000\times g$ ). Následně bylo odebráno  $600\text{ }\mu\text{l}$  supernatantu a peleta byla resuspendována ve zbylém supernatantu. Z takto vytvořené suspenze bylo odebráno  $30\text{ }\mu\text{l}$ , které byly rozetřeny na Petriho misku obsahující LB agar a antibiotika kanamycin ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) a chloramfenikol ( $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ ). Takto byly misky inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  přes noc (zhruba 16 h).

### 3.3.1.2 Příprava noční kultury

Po dokončení inkubace bylo pozorováno, že na misce s negativní kontrolou nedošlo ke vzniku kolonií, zatímco u buněk transformovaných plasmidem kolonie vznikly. Tento fakt indikoval správné provedení transformace, proto mohlo být dále pokračováno. Sterilní LB médium o objemu 20 ml s kanamycinem ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) a chloramfenikolem ( $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), bylo za pomoci sterilního párátko pod kahanem inokulováno kolonií z Petriho misky. Takto byla připravena noční kultura, jež byla ponechána přes noc (zhruba 17 h) na třepačce při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $200\text{ ot/min}$ .

### 3.3.1.3 Vlastní produkce proteinu TEAD1-DBD

Do čtyř Erlenmeyerových baněk o objemu 2 l, které obsahovaly  $0,5\text{ l}$  sterilního LB média s kanamycinem ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) a chloramfenikolem ( $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), bylo sterilní plastovou pipetou zaočkováno 5 ml noční kultury. Následně byly Erlenmeyerovy baňky třepány na třepačce Multitron Pro při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $200\text{ ot/min}$ ). V průběhu třepání byla spektrofotometrem DeNovix v 10 mm kyvetě měřena optická denzita (OD) při 600 nm. Když hodnota OD dosáhla 0,4, byla snížena teplota v třepačce na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (zhruba po 3 hodinách). Když hodnota OD dosáhla



0,6, bylo do každé ze čtyř Erlenmeyerových baněk přidáno 100  $\mu$ l IPTG o koncentraci 1 mol/l, tak aby výsledná koncentrace IPTG v médiu činila 0,2 mmol/l. Takto byly Erlenmeyerovy baňky ponechány při 30 °C a 200 ot/min v třepačce přes noc (zhruba 16 hodin).

#### 3.3.1.4 *Izolace TEAD1-DBD*

Po inkubaci byly vzorky centrifugovány na centrifuze Avanti s rotorem JA-9.1000 ve dvou kyvetách o objemu 1 l (15 min, 3000 $\times$  g, 4 °C). Dále bylo pracováno s bakteriálními peletami, jež byly resuspendovány – každá ve 40 ml ekvilibračního pufru pro afinitní chromatografii (složení viz *Tab. 1 na str. 34*). Vzniklá bakteriální suspenze byla rozdělena do čtyř 50ml jednorázových centrifugačních zkumavek a dezintegrována na sonikační sondě po dobu 3 $\times$  5 min. Po celou dobu sonikace byly vzorky umístěny na ledu, aby nedocházelo k jejich přehřívání. Následně byla provedena centrifugace ve čtyřech 50ml kyvetách (40 000 $\times$  g, 4 °C, 20 minut). Pro analýzu vzorků pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS-PAGE) bylo z buněčného lyzátu odebráno 10  $\mu$ l.

#### 3.3.1.5 *Afinitní chromatografie*

Pro purifikaci proteinu TEAD1-DBD bylo využito skutečnosti, že byla ve vektoru pET-28(+)-TEAD1-DBD obsažena sekvence kódující histidinovou kotvu. Supernatant vzniklý centrifugací v předchozím kroku byl separován na koloně naplněné nosičem Talon s kobaltnatými ionty. Pro sledování průběhu afinitní chromatografie bylo užito měření absorbance při 280 nm.

Nejprve byla kolona ekvilibrována 65 ml ekvilibračního pufru (viz *Tab. 1 na str. 34*) při průtoku mobilní fáze 2 ml/min a tlaku 400 kPa. Po nanesení buněčného lyzátu byla kolona dále promývána ekvilibračním pufrem, než došlo k ustálení absorbance na počáteční hodnotě. Následně byla kolona promývána promývacím pufrem obsahujícím 30mmol/l imidazol. Bylo vyčkáno na opětovné ustálení absorbance. Došlo však k jejímu mírnému zvýšení oproti počáteční hodnotě, neboť imidazol absorbuje při 280 nm. Následně byl vyměněn promývací pufr za eluční, jež obsahoval 0,5mol/l imidazol. Jakmile došlo ke zvýšení absorbance, byla jímána frakce obsahující protein TEAD1-DBD. Pro analýzu vzorků pomocí SDS-PAGE bylo z frakcí eluovaných jednotlivými pufrů odebráno 15  $\mu$ l.

**Tabulka 1** Složení jednotlivých pufrů použitých jako mobilní fáze pro obě provedené afinitní chromatografie. Veškeré pufrы byly před použitím filtrovány

Pufr	Složka
Ekvilibrační	25mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5M NaCl; 5mM merkaptoethanol; pH 7,5
Promývací	Ekvilibrační + 30mM imidazol; pH 7,5
Eluční	Ekvilibrační + 0,5M imidazol; pH 7,5

### 3.3.1.6 Dialýza, štěpení a odstranění histidinové kotvy

U jímáné frakce z afinitní chromatografie obsahující TEAD1-DBD, která měla objem 11 ml, byla změřena absorbance při 280 nm na spektrofotometru DeNovix. Následně byla vypočtena hmotnostní koncentrace proteinu v roztoku 0,9 mg/ml. Jak již bylo zmíněno výše, pro izolaci proteinu byla užita histidinová kotva, která byla od sekvence TEAD1-DBD oddělena štěpným místem pro thrombin. K jejímu odštěpení byl k roztoku proteinu přidán thrombin tak, aby jeho aktivita činila 1 U na miligram proteinu ve vzorku. Bylo tudíž přidáno 10  $\mu$ l enzymu o aktivitě 1 U/ $\mu$ l. Následně byl vzorek přelit do dialyzační trubice a byl dialyzován proti 2 l ekvilibračního pufru (složení dle Tab. 1), který již neobsahoval 2-merkaptoethanol. Dialýza probíhala přes noc (po dobu zhruba 17 h) při teplotě 4 °C za stálého míchání na magnetické míchačce.

Pro oddělení odštěpené histidinové kotvy nebo proteinu s neodštěpenou histidinovou kotvou od DNA vazebné domény proteinu TEAD1-DBD byla užita druhá afinitní chromatografie. Na chromatografickou kolonu s nosičem Talon, ekvilibrovanou ekvilibračním pufrem (totožným, který byl použit pro předchozí afinitní chromatografii, složení viz Tab. 1), byl nanesen obsah dialyzační trubice. Následně byla kolona promývána Ek pufrem a jakmile došlo ke zvýšení absorbance při 280 nm, byla jímána frakce obsahující TEAD1-DBD, která byla chlazená na ledu. Z této frakce bylo odebráno 15  $\mu$ l pro vzorek na SDS-PAGE. Následně byla kolona promyta elučním pufrem a poté promyta a uchovávána ve 20% ethanolu. Po celou dobu průběhu afinitní chromatografie byl nastaven průtok mobilní fáze kolonou na 2 ml/min. Frakce s proteinem TEAD1-DBD byla koncentrována v 15ml centrifugačních koncentrátorech s MWCO 3000 Da. Centrifugace probíhala při 3500 $\times$  g a 4 °C na centrifuze Eppendorf, než bylo dosaženo požadovaného objemu (zhruba 950  $\mu$ l, cca 30 min).

### 3.3.1.7 *Gelová permeační chromatografie*

Jako závěrečný purifikační krok pro TEAD1-DBD byla užita gelová permeační chromatografie na koloně ENrich SEC 70 10×300 mm připojené do chromatografického systému NGC Quest 10. V tomto kroku byl protein TEAD1-DBD oddělen od thrombinu či zbylých bakteriálních proteinů a převeden do HEPES pufru (20mmol/l HEPES, 150mmol/l NaCl, 1mmol/l TCEP, pH 7,0), určeného pro delší skladování proteinu. Nejprve byl celý chromatografický systém promyt HEPES pufrem a poté byla pod průtokem 0,3 ml/min připojena kolona ENrich SEC 70 10×300 mm, která byla následně ekvilibrována při průtoku 1 ml/min po dobu zhruba 1 h (2,5 objemu kolony). Následně byl do 1ml dávkovací smyčky pomocí mikrostříkačky aplikován koncentrovaný vzorek obsahující TEAD1-DBD (950  $\mu$ l). Průtok mobilní fáze systémem byl snížen na 0,8 ml a průběh gelové permeační chromatografie byl monitorován pomocí UV/VIS a vodivostního detektoru, jež sledovaly absorbanci při 280 nm a konduktivitu vzorku. Po aplikaci vzorku do systému byl též spuštěn automatický jímač frakcí, který sbíral 5ml frakce. Ve chvíli, kdy došlo ke zvýšení absorbance nad 30 mAU, byl snížen objem jímaných frakcí na 1 ml. Gelová permeační chromatografie byla ukončena poté co došlo k nárůstu konduktivity, který byl způsoben zvýšeným obsahem solí ve 3. frakci (viz *Obr. 15 na str. 44*). Z 1. a 2. frakce bylo odebráno 15  $\mu$ l pro přípravu vzorku na SDS-PAGE. Následně byl celý systém i s kolonou promyt 200 ml 20% ethanolu.

### 3.3.1.8 *Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS*

Pro ověření průběhu purifikace DNA vazebné domény proteinu TEAD1 byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Vzorky, odebírané v průběhu jednotlivých purifikačních kroků, shrnuté v *Tab. 2 na str. 36*, byly připraveny smísením 4× koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru se vzorkem. Následně byly vzorky zahřáty v termostatu na teplotu 95 °C po dobu 5 minut. Poté byly vzorky krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze po dobu cca 2 min a 5000× g.

**Tabulka 2** Schéma nanášky vzorků na gel pro SDS-PAGE. V tabulce jsou uvedena též složení jednotlivých vzorků a jejich množství nanesená na gel (Obr. 16 na str. 45). Čísla vzorků si odpovídají v pořadí zleva. Pro lepší přehlednost užity zkratky ACH pro afinitní chromatografii, GCH pro gelovou permeační chromatografii, D. pro dráhu na gelu (viz Obr. 16 na str. 45) a p. pro pufr. Užitý standard – Invitrogen™ SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard.

D.	Popis vzorku	Nanáška na gel [μl]	Složení 20 μl vzorku [μl]		
			4× konc. vz. pufr	Vzorek	dH <sub>2</sub> O
S	Standard	5	-	-	-
1	Buněčný lyzát po sonikaci	10	5	10	5
2	Ekvilibrační p. při 1. ACH	10	5	15	0
3	Promývací p. při 1. ACH	5	5	-	-
4	Eluční p. při 1. ACH	10	5	15	0
S	Standard	5	-	-	-
5	Ekvilibrační p. při 2. ACH	10	5	15	0
6	3. frakce z GCH	10	5	15	0
7	7. frakce z GCH	10	5	15	0
S	Standard	5	-	-	-

Separace proběhla v 1,0 mm tlustém polyakrylamidovém gelu složeném z 5% zaostřovacího a 15% separačního gelu. Nejprve byl dle Tab. 3 na str. 37 připraven malopórový separační polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi důkladně odmaštěná skla elektroforetické aparatury tak, aby dosahoval zhruba 1,5 cm pod okraj skel. Hned po nalití byl gel opatrně převrstven vodou. Po zhruba 30 min, kdy došlo k polymerizaci a zatuhnutí gelu, byl připravený separační gel převrstven velkopórovým zaostřovacím gelem, do něhož byl umístěn hřeben pro vytvoření deseti jamek pro nanesení vzorků. Následně byly na gel automatickou pipetou aplikovány vzorky dle Tab. 2 a aparatura byla zapojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Elektroforéza probíhala v prostředí Tris-glycin SDS pufru a probíhala při napětí 200 V po dobu zhruba 65 minut, než čelo doputovalo přibližně 0,5 cm před konec gelu.

Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a ponořen do barvicí lázně obsahující Coomassie Brilliant Blue, kde byl zhruba 20 minut barven. Poté byl umístěn do odbarvovacího roztoku, který byl po 30 min vyměněn za nový, a takto byl gel ponechán odbarvovat přes noc. Po odbarvení byl gel vyfotografován pomocí fotodokumentačního boxu a následně skladován v 1% kyselině octové.

**Tabulka 3** Složení gelů pro diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu. Uvedeny jsou pipetované objemy pro přípravu 5% velkopórového zaostřovacího a 15% malopórového separačního gelu.

Složka	Objem složky pro přípravu 5 ml gelu [ml]	
	15% separační gel	5% zaostřovací gel
dH <sub>2</sub> O	1,1	0,68
30% akrylamidová směs	2,5	0,17
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	-
1M Tris (pH 6,8)	-	0,13
10% SDS (dodecylsírán sodný)	0,05	0,01
10% APS (peroxodisírán amonný)	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

### 3.3.2 Ověření schopnosti proteinu vázat dvouvláknovou DNA

#### 3.3.2.1 Nativní gelová elektroforéza

Pro ověření schopnosti TEAD1-DBD vázat dvouvláknovou DNA byla užita nativní gelová elektroforéza. Nejprve byly připraveny dvouvláknové DNA smísením r- a f- oligonukleotidů pro *C-MYC* enhancer a *C-MYC* exon v poměru 1:1. Z 1mmol/l zásobních roztoků jednotlivých oligonukleotidů byly připraveny 100 μmol/l roztoky dsDNA. Pro *C-MYC* enhancer bylo smíseno 10 μl *C-MYC* enhancer r, 10 μl *C-MYC* enhancer f a 80 μl deionizované vody, stejně bylo postupováno i u *C-MYC* exonu. Připravené směsi oligonukleotidů byly zahřáty v termostatu na 95 °C po dobu 5 min a následně ponechány vychladnout při laboratorní teplotě.

Roztok proteinu TEAD1-DBD získaný po gelové permeační chromatografii byl na 4ml centrifugačních koncentrátoch koncentrován na 100 μmol/l, centrifugováno bylo při 4000× g, 4 °C po dobu zhruba 25 min. Počáteční i výsledná koncentrace byly určena spektrofotometricky na spektrofotometru DeNovix. Dále byly ze 100 μmol/l roztoků dsDNA připraveny 10 μmol/l roztoky přidáním 5 μl 100 μmol/l dsDNA k 45 μl deionizované vody. Takto připravené roztoky byly dále použity pro přípravu vzorků pro nativní gelovou elektroforézu. Vzorky o celkovém objemu 12 μl byly připraveny obdobně pro *C-MYC* enhancer i *C-MYC* exon, dle Tab. 4 na str. 38.

**Tabulka 4** Složení vzorků připravených pro nativní gelovou elektroforézu. V tabulce uvedeno složení jednotlivých vzorků v pořadí, jak byly nanášeny na gel. Pro přehlednost užit jeden sloupec pro r i f oligonukleotidy, pipetován do vzorku byl však vždy pouze příslušný oligonukleotid, označený zkratkou za objemem. Též byla použita zkratka pr. pro protein.

Vzorek		Objem jednotlivých složek vzorku [μl]					Vzorkový pufr
		1mM ssDNA r/f	10 μM dsDNA	100 μM dsDNA	100 μM protein	HEPES pufr	
1	ssDNA r	1,2 (r)	-	-	-	8,8	2
2	ssDNA f	1,2 (f)	-	-	-	8,8	2
3	dsDNA	-	-	10	-	-	2
4	protein	-	-	-	1	-	2
5	1 μM DNA + pr.	-	1	-	1	8	2
6	3 μM DNA + pr.	-	3	-	1	6	2
7	5 μM DNA + pr.	-	5	-	1	4	2
8	10 μM DNA + pr.	-	-	1	1	8	2
9	20 μM DNA + pr.	-	-	2	1	7	2
10	40 μM DNA + pr.	-	-	4	1	5	2

Následně byly připraveny dva polyakrylamidové gely pro nativní gelovou elektroforézu o tloušťce 1 mm dle Tab. 5. Pomocí hřebenu bylo v každém z gelů vytvořeno 10 jamek pro aplikaci vzorků. Poté bylo do každé z jamek gelu automatickou pipetou naneseno 10 μl vzorků připravených dle Tab. 4. v uvedeném pořadí 1-10. Do prvního z gelů byly pipetovány vzorky s *C-MYC* enhancerem, do druhého pak s *C-MYC* exonem.

Nativní gelová elektroforéza byla spuštěna po aplikaci vzorků na gely při konstantním napětí 75 V (37,5 V na jeden gel) v prostředí 1× koncentrovaného TBE pufru za současného chlazení v lázni tvořené směsí voda–led. Elektroforéza byla ukončena po zhruba 70 minutách, jakmile bromfenolová modř obsažená ve vzorkovém pufru doputovala přibližně do poloviny gelu.

**Tabulka 5** Složení gelu pro nativní gelovou elektroforézu. Uvedeny objemy pro přípravu 10 ml gelu.

Složka	Objem složky [ml]
dH <sub>2</sub> O	5
30% akrylamidová směs	4
10× TBE (pH 8,3)	1
10% peroxodisíran amonný (APS)	0,08
TEMED	0,008

Po ukončení nativní gelové elektroforézy bylo provedeno specifické barvení nukleových kyselin komerčně dostupnou barvou GelRed. Pro dosažení požadované koncentrace bylo 15  $\mu$ l GelRed přidáno do 50 ml deionizované vody. Takto byly připraveny dvě barvicí lázně (každá o objemu 50 ml), kde byl každý z gelů barven po dobu 55 min. Následně byly gely vyfotografovány ve fotodokumentačním boxu. Pro vizualizaci bylo použito UV záření o vlnové délce 312 nm.

Po dokončení fotodokumentace bylo provedeno barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue, obdobně, jak již bylo popsáno v kapitole 3.3.1.8 *Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS*. Následně byly gely opět vyfotografovány pomocí fotodokumentačního boxu a uchovávány v 1% kyselině octové.

### 3.3.3 Studium proteinu TEAD1-DBD a jeho komplexů s DNA

#### 3.3.3.1 Příprava vzorků pro nativní hmotnostní spektrometrii

Studium proteinu TEAD1-DBD a jeho komplexů s dsDNA pomocí nativní hmotnostní spektrometrie není možné provést přímo u proteinu získaného pomocí gelové chromatografie v HEPES pufru, jak bylo popsáno v kapitole 3.3.1.7 *Gelová permeační chromatografie*. Pro účely nativní nESI ionizace bylo nutné převést vzorky do vhodného pufru kompatibilního s hmotnostní spektrometrií. V tomto případě byl použit 150mmol/l octan amonný (v LC-MS kvalitě). Proto byla provedena výměna pufru u proteinu pomocí odsolovacích kolonek Micro Bio-Spin. Pro přípravu vzorků byla použita centrifuga Hettich. Pro odstranění uchovávacího pufru byla kolonka centrifugována ( $1000\times g$ , 2 min, 4 °C). Následně byla převrstvena 500  $\mu$ l 150mmol/l octanu amonného a centrifugována ( $1000\times g$ , 1 min, 4 °C), tento krok byl opakován a proveden celkem čtyřikrát. Následně bylo na kolonku aplikováno 30  $\mu$ l 100 $\mu$ mol/l proteinu v HEPES pufru (koncentrovaného v kapitole 3.3.2.1 *Nativní gelová elektroforéza*). Následně byla kolonka se vzorkem centrifugována ( $1000\times g$ , 2 min, 4 °C) a dále bylo pracováno s proteinem převedeným do 150mmol/l octanu amonného. Tento krok byl opakován každý den měření kvůli snížené stabilitě proteinu v octanu amonném. Následně byla u proteinu měřena absorbance při 280 nm na spektrofotometru DeNovix, ze které byla vypočtena koncentrace. Poté byl roztok zředěn 150mmol/l octanem amonným na požadovanou koncentraci 20 $\mu$ mol/l.

Dále byly připraveny 20 $\mu$ mol/l roztoky dvouvláknových DNA v 150mmol/l octanu amonném. Při přípravě 100 $\mu$ mol/l roztoku dsDNA bylo postupováno totožně jako v kapitole 3.3.2.1 *Nativní gelová elektroforéza*. Následně byla provedena výměna pufrů pomocí

odsolovacích kolonek Micro Bio-Spin, po přípravě kolonky, jež byla popsána výše, bylo nanášeno 30  $\mu$ l dsDNA a centrifugováno ( $1000\times g$ , 2 min, 4 °C). Poté byla z absorbance při 260 nm (spektrofotometr DeNovix) vypočtena koncentrace a dále bylo ředěno tak, aby bylo dosaženo 20  $\mu$ mol/l koncentrace.

Pro vlastní měření byly použity vzorky o koncentraci 10  $\mu$ mol/l. Proto byly roztoky pro měření samostatné dsDNA a proteinu ještě  $2\times$  ředěny 150 mmol/l octanem amonným. V případě protein–DNA komplexu byly smíseny 20  $\mu$ mol/l zásobní roztoky proteinu a DNA v poměru 1:1. Takto připravené vzorky o objemu 10  $\mu$ l byly aplikovány automatickou pipetou do nESI emitterů uchycených v držáku. Následně byl nESI emitter krátce centrifugován ( $1000\times g$ , 15 s) na stolní minicentrifuze, aby došlo k proniknutí roztoku do jeho špičky.

### 3.3.3.2 IM-MS analýza vzorků

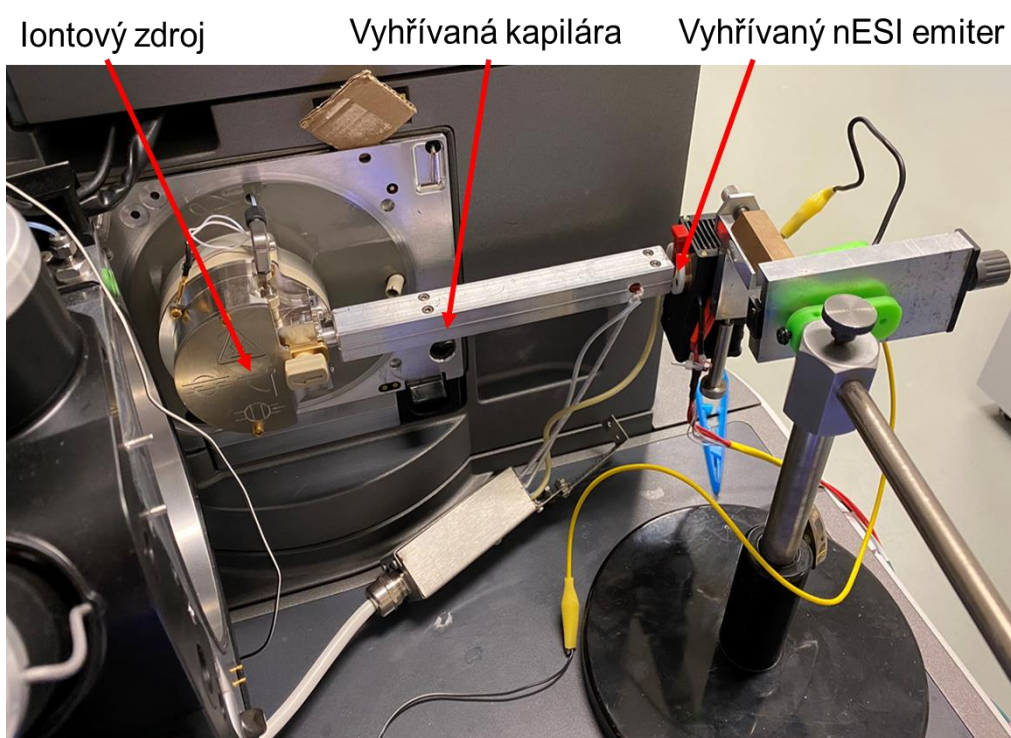
Takto připravený emitter byl umístěn před vyhřívanou kapiláru předřazenou vstupu do hmotnostního spektrometru. Následně do něj bylo zasunuto důkladně očištěné kovové vlákno připojené ke zdroji vysokého napětí, jak je znázorněno na *Obr. 12 na str. 41*. Předřazení vyhřívané kapiláry před vstup do hmotnostního spektrometru bylo použito, neboť díky ní docházelo ke snížení perturbace proteinů a minimalizaci nechtěných aktivací [41].

Nastavení a kalibrace hmotnostního spektrometru byly provedeny Mgr. Janem Fialou, shrnutí základních parametrů viz *Příloha 1*. Jak bylo zmíněno v kapitole *1.2.4.1 Instrumentace v iontové mobilitě* u IM-MS instrumentace s TWIMS není možné určit CCS přímo z „drift time“, ale je nutné provést kalibraci proteiny o známém kolizním průřezu. Proto byly do nESI emitteru aplikovány již připravené 10  $\mu$ M vzorky proteinů:  $\beta$ -laktoglobulinu, cytochromu C a ubiquitinu, pro každý z těchto proteinů bylo provedeno měření iontových mobilit v triplicátu.

Pro účely této práce byly vybrány dvě aktivace vzorku, a to kolizní aktivace pomocí molekul inertního plynu v kolizní cele, jež byla popsána v kapitole *1.2.4.2 Aktivace a iontová mobilita* ve spojení s MS a aktivace spojená s perturbací vzorku zahříváním sprejovaného roztoku. Pro studium chování proteinu a protein–DNA komplexů při zahřívání sprejovaného roztoku byl nESI emitter umístěn do vyhřívaného měděného těla (viz *Obr. 12 na str. 11*), které bylo pro jednotlivá měření zahříváno po 5 °C krocích v intervalu mezi 25 až 95 °C. Měření bylo takto provedeno v pozitivním módu pro protein,



oba oligonukleotidy (*C-MYC* enhancer i exon) a oba protein–DNA komplexy. Pro studium kolizně indukovaného rozbalování nebylo nutné užít vyhřívané aparatury (vyhřívané měděné tělo z *Obr. 12*), proto byl nESI emiter umístěn v držáku přímo před vyhřívanou kapilárou (vstup do hmotnostního spektrometru). Následně byla mezi jednotlivými měřeními v kolizní cele zvyšována kolizní energie v krocích: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 eV. Stejně jako u tepelné aktivace bylo provedeno měření v pozitivním módu pro protein, oba oligonukleotidy a oba protein–DNA komplexy.



**Obrázek 12** Fotografie aparatury použité pro měření na hmotnostním spektrometru Waters Synapt G2-Si. K iontovému zdroji hmotnostního spektrometru byla připojena vyhřívaná kapilára a nESI emiter umístěn pro sprejování zahříváného roztoku v měděném těle.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD

Prvním z cílů této práce byla rekombinantní exprese DNA-vazebné domény proteinu TEAD1, jehož sekvenci znázorňuje *Obr. 13*. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.3.1.5 *Afinitní chromatografie*, pro purifikaci proteinu bylo použito zařazení histidinové kotvy tvořené šesti histidiny na N-konci proteinu. Histidinová kotva byla od vlastní sekvence DNA-vazné domény proteinu TEAD1 oddělená štěpným místem pro thrombin.

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSADKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIY  
PPCGRRKIIILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHQVLARR  
KSRD

**Obrázek 13** Sekvence proteinu TEAD1-DBD s histidinovou kotvou. Zeleně znázorněno šest histidinů tvořících polyhistidinovou kotvu, modře štěpná sekvence pro thrombin. Sekvence oddělená při štěpění kotvy označena podtržením.

Molekulová hmotnost (monoizotopická) proteinu s histidinovou kotvou je 11817,06 Da, průměrná molekulová hmotnost pak 11824,41 Da. Pro TEAD1-DBD byla vypočtena (bez histidinové kotvy) monoizotopická hmotnost 9936,19 Da a průměrná 9942,35 Da.

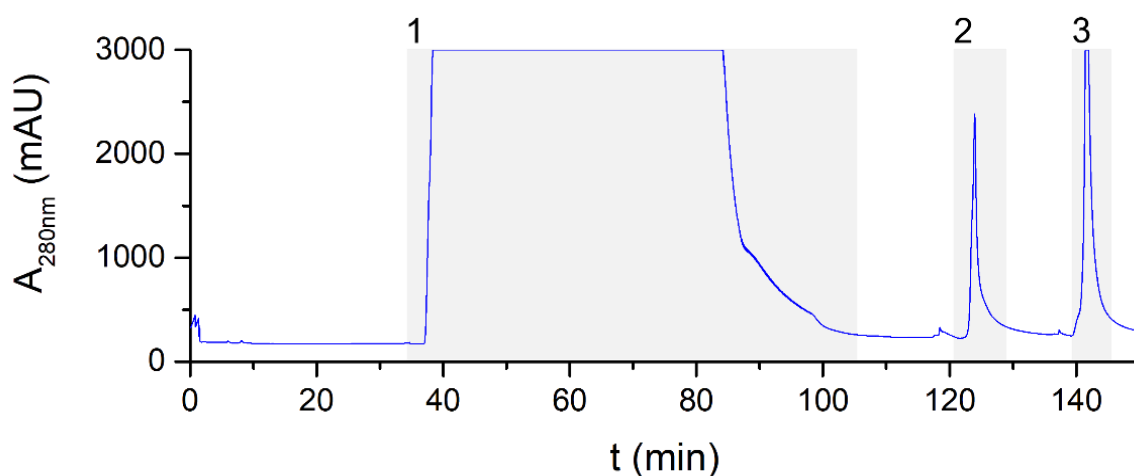
#### 4.1.1 Afinitní chromatografie

Prvním purifikačním krokem byla afinitní chromatografie na nosiči Talon s navázanými kobaltnatými ionty, viz kapitola 3.3.1.5 *Afinitní chromatografie*. V tomto kroku bylo využito přítomnosti histidinové kotvy schopné interakce s ionty kovu imobilizovanými na nosiči. Pro eluci navázaných proteinů byl užit imidazol, který je schopný svými dusíky kompetitivně interagovat s nosičem. Záznam absorbance při 280 nm z chromatografie je v grafu na *Obr. 14 na str. 43*. Z jednotlivých eluovaných frakcí byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE *Obr. 16 na str. 45*.

V první frakci, eluované ekvilibračním pufrem, označené v chromatogramu č. 1 (*Obr. 14 na str. 43*) se nacházelo velké množství proteinů z buněčného lyzátu, jež neinteragovaly s kobaltnatými ionty obsaženými na nosiči. Tato skutečnost vysvětluje vysokou absorbanci píku frakce 1 ve srovnání s ostatními frakcemi. Z této frakce, jímané v čase 40-100 min, byl připraven vzorek č. 2 pro SDS-PAGE.

Ve druhé frakci, eluované promývacím pufrém s 30mmol/l obsahem imidazolu, byly eluovány nespecificky navázané proteiny, jež byly schopné slabší interakce s imobilizovanými ionty kovu, než tomu bylo u TEAD1-DBD s histidinovou kotvou. Frakce č. 2 byla jímána mezi 121. a 128. minutou a byl z ní připraven vzorek č. 3 pro SDS-PAGE.

Třetí frakce na chromatogramu, byla eluována 0,5mol/l imidazolem, obsahovala protein TEAD1-DBD spolu s dalšími proteiny, které byly schopny silnější interakce s imobilizovanými kobaltnatými ionty. Objem frakce jímáné mezi 139 a 144 minutou činil 11 ml a byl z ní připraven vzorek č. 4 pro SDS-PAGE.

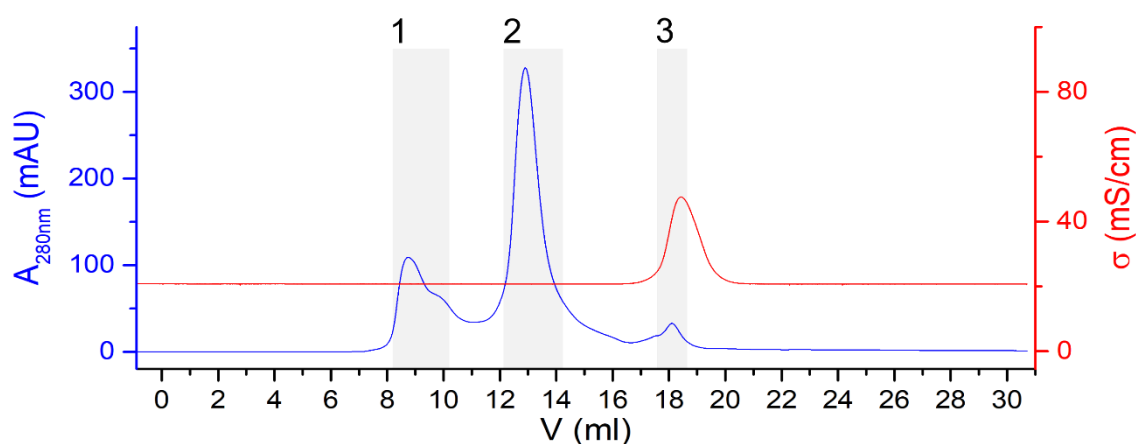


**Obrázek 14** Záznam afinitní chromatografie provedené na nosiči Talon s kobaltnatými ionty. Vynesena byla závislost absorbance při 280 nm (mAU) na čase (min). Graficky jsou zvýrazněny jímáné frakce eluované jednotlivými pufrý 1 – ekvilibrační, 2 – promývací, 3 – eluční. 3. frakce, obsahující protein TEAD1-DBD byla jímána mezi 139 a 146 min. Některé signály nejsou v chromatografickém záznamu kompletně viditelné, jelikož je rozsah detektoru chromatografického systému NGC Quest 10 limitován hodnotou 3000 mAU.

#### 4.1.2 Gelová permeační chromatografie

Posledním z purifikačních kroků byla gelová permeační chromatografie. Ta následovala po dialýze spojené se štěpením histidinové kotvy a druhé afinitní chromatografii, jež sloužila pro oddělení proteinu TEAD1-DBD od odštěpené kotvy a proteinu s neodštěpenou kotvou. Při gelové permeační chromatografii došlo k dělení molekul na základě jejich velikosti, největší byly eluovány nejdříve. Záznam z gelové permeační chromatografie provedené na koloně ENrich SEC 70 10×300 mm pomocí chromatografického systému NGC Quest 10 viz Obr. 15 na str. 44.

První jímaná frakce obsahovala větší proteiny, než je DNA-vazebná doména proteinu TEAD. Ve druhé frakci (zhruba 12-14 ml v grafu na *Obr. 15*) byl obsažen exprimovaný protein TEAD1-DBD, který byl využit pro další experimenty. Z obou frakcí 1 a 2 byly připraveny vzorky č. 6 a 7 pro SDS-PAGE. Třetí jímaná frakce, po níž byla gelová permeační chromatografie ukončena, obsahovala imidazol. Při její eluci došlo ke zvýšení absorbance při 280 nm doprovázené nárůstem konduktivity.



**Obrázek 15** Záznam gelové permeační chromatografie na koloně ENrich SEC 70 10×300 mm. Modře znázorněna závislost absorbance při 280 nm (mAU) na retenčním objemu (ml), červeně pak závislost konduktivity (mS/sm) na objemu (ml). Graficky znázorněny jímané frakce, 1. a 2. obě o objemu 2 ml, byly použity pro přípravu vzorků na SDS-PAGE.

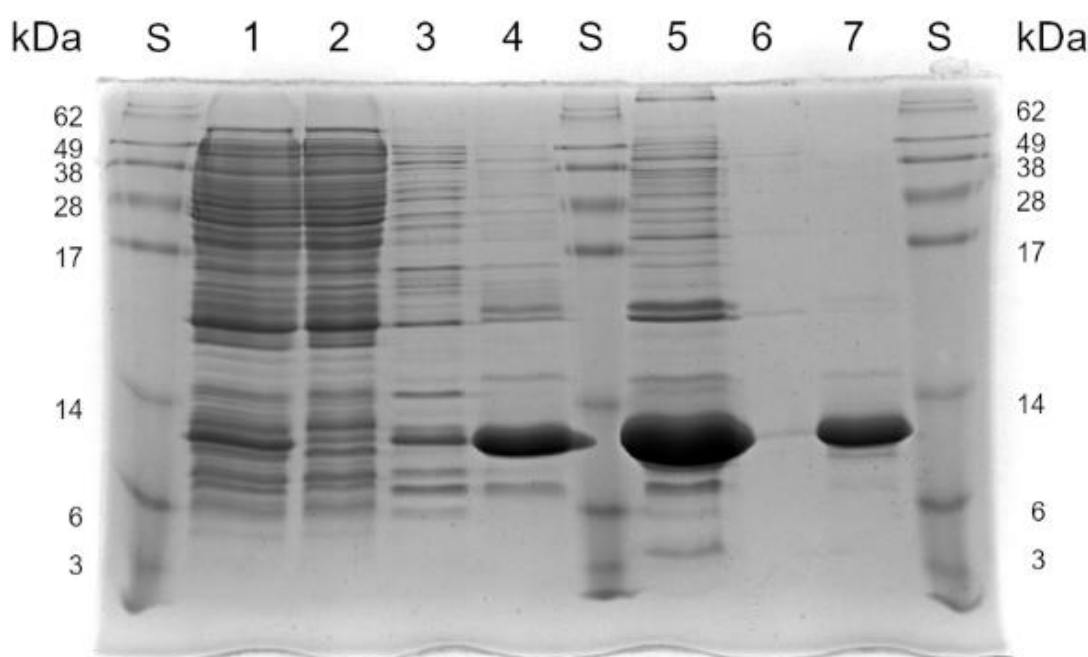
#### 4.1.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS

Pro vizualizaci průběhu jednotlivých purifikačních kroků proteinu TEAD1-DBD byla využita diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. Získaný gel viz *Obr. 16 na str. 45*.

Vzorky v pořadí zleva odpovídají pořadí jednotlivých purifikačních kroků. Jak již bylo zmíněno, průměrná molekulová hmotnost proteinu TEAD-1 DBD bez histidinové je 9,9 kDa a s histidinovou kotvou 11,2 kDa, na obrázku gelu se proto exprimovaný protein nachází mezi 6kDa a 14kDa pruhy standardu. U vzorku č. 1 (buněčný lyzát nanesený na první afinitní chromatografii) je ve zmíněné oblasti patrný výraznější pruh, který odpovídá produkovánému proteinu a značí, že předcházející kroky, uvedené v kapitole 3.3.1 *Rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD*, byly provedeny správně a došlo k expresi proteinu.

Průběh první afinitní chromatografie zaznamenávají vzorky 2-4. Nepřítomnost pruhu odpovídajícímu TEAD1-DBD ve vzorku 2 a naopak jeho přítomnost ve vzorku 4 značí, že při tomto kroku došlo částečně k purifikaci exprimovaného proteinu. Ve vzorku 4 je kromě výrazného pruhu odpovídajícího TEAD1-DBD ještě několik slabších pruhů, převážně odpovídajících vyšším molekulovým hmotnostem. Tato skutečnost naznačuje, že s nosičem užitým pro afinitní chromatografii byly schopné interagovat kromě DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 s histidinovou kotvou i jiné proteiny obsažené v bakteriálním lyzátu.

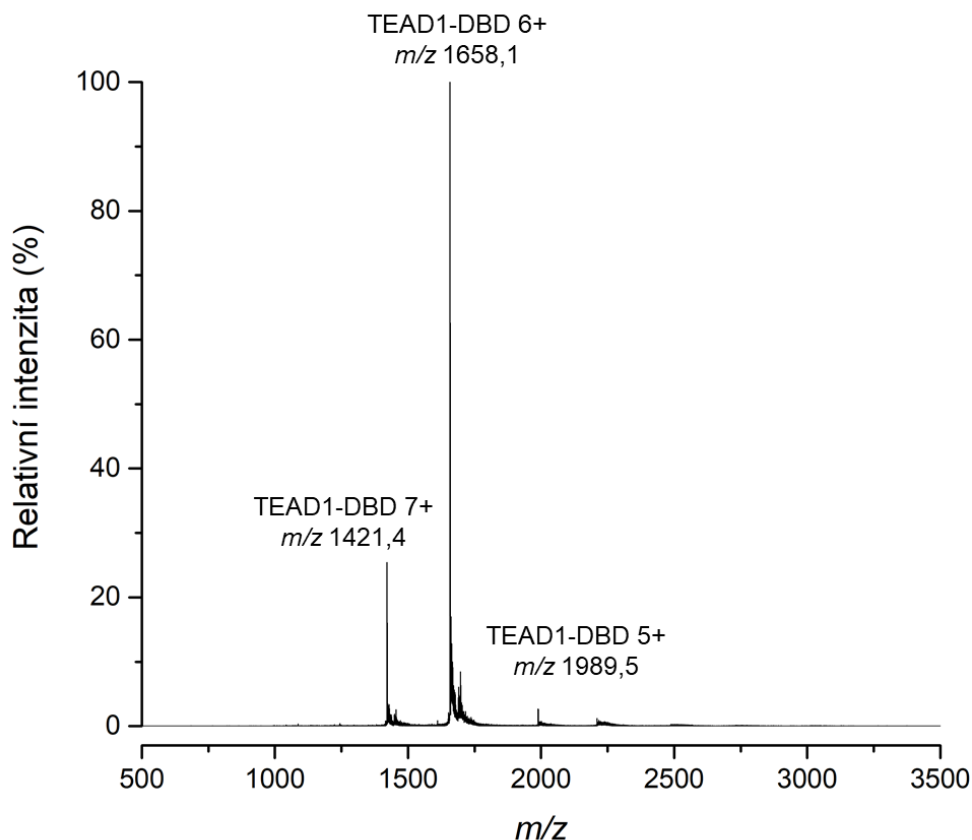
Porovnáním vzorků 5 a 7 je patrný vliv gelové permeační chromatografie na čistotu výsledného produktu. Z dráhy vzorku 6, je zřejmé že v 1. frakci z gelové permeační chromatografie (*Obr. 15 na str. 44*) byly obsaženy větší proteiny než TEAD1-DBD (např. slabší pruh mezi 14 a 17 kDa).



**Obrázek 16** Polyakrylamidový gel z diskontinuální elektroforézy za přítomnosti SDS. Nanáška vzorků a jejich složení odpovídá Tab. 2 na str. 36. Vzorky zleva: **S** – standard, **1** – bakteriální lyzát, **2** – 1. afinitní chromatografie eluce ekvilibračním pufrem, **3** – 1. afinitní chromatografie eluce promývacím pufrem, **4** – 1. afinitní chromatografie eluce elučním pufrem, **5** – vzorek injektovaný na gelovou permeační chromatografii, **6** – 1. frakce z gelové permeační chromatografie, **7** – 2. frakce z gelové permeační chromatografie.

#### 4.1.4 Nativní ionizace elektrosprejem

Pro ověření, zda je purifikovaný protein, obsažený ve 2. frakci z gelové permeační chromatografie a vizualizovaný ve vzorku 7 pomocí SDS-PAGE opravdu TEAD1-DBD, byla užita nativní ionizace nanoelektrosprejem. Získané hmotnostní spektrum viz *Obr. 17*.



**Obrázek 17** Hmotnostní spektrum proteinu TEAD1-DBD, získané pomocí nativní nESI v pozitivním módu. Vynesena závislost relativní intenzity v (%) na poměru hmotnosti ku náboji. Popsány jsou tři nejvýraznější píky odpovídající nábojovým stavům proteinu TEAD1-DBD.

Jednotlivé naměřené nábojové stavy, popsané na *Obr. 17*, odpovídají průměrné molekulové hmotnosti proteinu 9,942 kDa. Ze získaného hmotnostního spektra je tudíž patrné, že je exprimovaný protein opravdu kompletní DNA-vazebná doména proteinu TEAD1, jejíž sekvence byla již uvedena (*Obr. 13 na str. 42*).

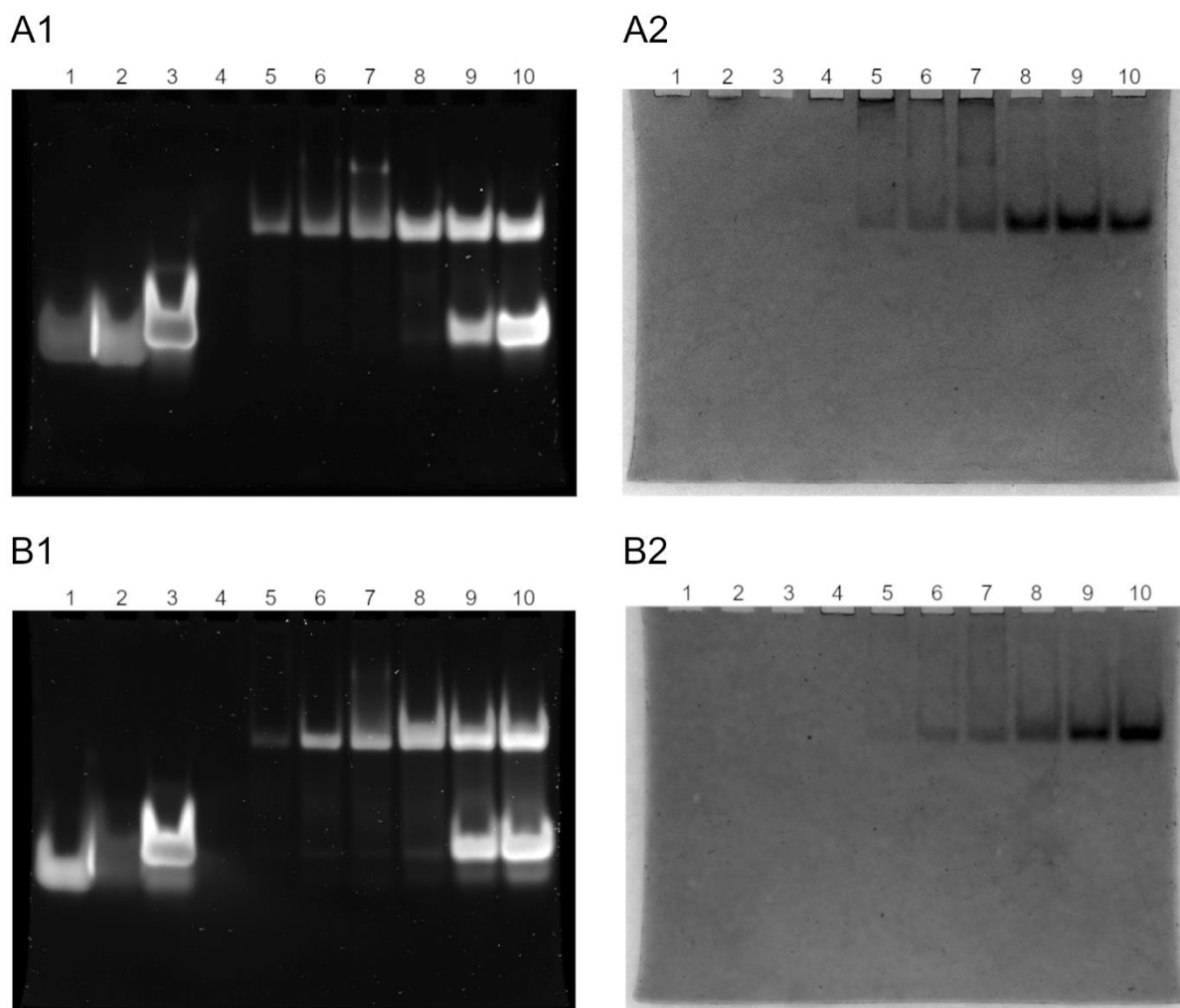
## 4.2 Ověření schopnosti proteinu TEAD1-DBD vázat dvouvláknovou DNA

Pro ověření schopnosti exprimované DNA-vazebné domény proteinu TEAD interagovat s dvouvláknovou DNA obsahující M-CAT element, byly vybrány dsDNA z exonu a enhanceru genu *C-MYC*. Schopnost proteinu vázat tyto dvouvláknové DNA byla potvrzena pomocí nativní gelové elektroforézy a nativní nESI.

### 4.2.1 Nativní gelová elektroforéza

První z metod, jež byla použita pro ověření schopnosti interakce proteinu s dsDNA, byla nativní gelové elektroforéza. Gely získané touto metodou byly barveny dvakrát, nejprve v GelRed pro specifické barvení DNA a poté Comassie Brilliant Blue pro vizualizaci proteinů. Při nativní gelové elektroforéze v polyakrylamidovém gelu putuje za daných podmínek protein TEAD1-DBD pouze v případě, že dojde k jeho interakci se záporně nabitou DNA. To je potvrzeno v dráze č. 4 na každém z gelů, kam byl nanesen pouze protein TEAD-1 DBD. Ani při jednom z uvedených barvení není v této dráze patrný pruh, který by odpovídal proteinu. Naopak pohyblivost nukleových kyselin byla ověřena v drahách 1, 2 a 3 při barvení GelRed (*Obr. 18 na str. 8 A1 a B1*), kam byly nanесeny obě jednovláknové DNA a dvouvláknová DNA.

Do drah 4–10 pro oba gely (s *C-MYC* exonem i *C-MYC* enhancerem) byla aplikována stejná koncentrace proteinu (10  $\mu$ M) a zvyšující se koncentrace dvouvláknové DNA. Pruhy s vyšší pohyblivostí odpovídají volné dsDNA. Pruhy s nižší pohyblivostí, které jsou blíže startu, patří protein DNA komplexu, což naznačuje i srovnání obou barvení. Z výsledků pro oba oligonukleotidy je patrné, že se vzrůstající koncentrací DNA docházelo ke zvýšení intenzity pruhu odpovídajícímu komplexu. U vzorků s *C-MYC* exonem **A** i *C-MYC* enhancerem **B** se intenzita pruhu odpovídajícímu komplexu zvyšovala do té doby, než byla koncentrace proteinu a dsDNA stejná, 10  $\mu$ M. Dále byl se zvyšující se koncentrací dvouvláknové DNA pozorován mírný nárůst intenzity u pruhů odpovídajících komplexům a velký nárůst intenzity pruhů patřících dsDNA.

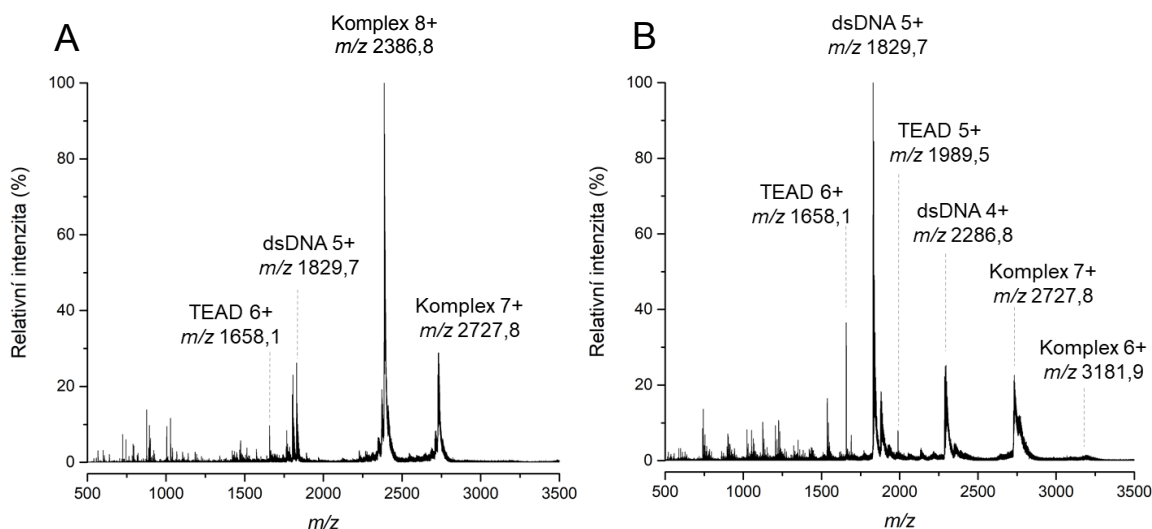


**Obrázek 18** Gely nativní elektroforézy proteinu TEAD s DNA oligonukleotidy C-MYC exonem (**A1** a **A2**) a C-MYC enhancerem (**B1** a **B2**). Na obr. **A1** a **B1** bylo provedeno specifické barvení nukleových kyselin pomocí GelRed, na obr. **A2** a **B2** bylo užito barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue. Vzorky v pořadí zleva odpovídají Tab. 4 na str. 38: **1** – ssDNA (r), **2** – ssDNA (f), **3** – dsDNA, **4** – 10  $\mu$ M protein, **5** – 10  $\mu$ M protein + 1  $\mu$ M dsDNA, **6** – 10  $\mu$ M protein + 3  $\mu$ M dsDNA, **7** – 10  $\mu$ M protein + 5  $\mu$ M dsDNA, **8** – 10  $\mu$ M protein + 10  $\mu$ M dsDNA, **9** – 10  $\mu$ M protein + 20  $\mu$ M dsDNA, **10** – 10  $\mu$ M protein + 50  $\mu$ M dsDNA



## 4.2.2 Nativní ionizace elektrosprejem

Druhá z metod, kterou byla ověřena schopnost proteinu tvořit komplexy s dvouvláknovou DNA, byla hmotnostní spektrometrie spojená s využitím nativní nESI ionizace. V hmotnostních spektrech na *Obr. 19 A* pro TEAD1-DBD a *C-MYC* exon o průměrné molekulové hmotnosti 19 086 Da a *Obr. 19 B* pro TEAD1-DBD a *C-MYC* enhancer o průměrné molekulové hmotnosti 19 086 Da byly zaznamenány signály odpovídající nábojovým stavům jednotlivých komplexů.



**Obrázek 19** Hmotnostní spektra komplexů proteinu TEAD1-DBD s **A** *C-MYC* exonem **B** *C-MYC* enhancerem získaná za použití nativní nESI ionizace. V hmotnostních spektrech byly přiřazeny nejintenzivnější píky patřící nábojovým stavům komplexů, dsDNA a proteinu.

## 4.3 Studium proteinu a protein–DNA komplexů pomocí nativní hmotnostní spektrometrie

Pro studium proteinu TEAD1-DBD a jeho komplexů s dvouvláknovou DNA byla použita nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou. V této práci byly využity dvě aktivace, kolizně indukované rozbíjení srážkami s inertním plynem v kolizní cele a perturbace sprejovaného roztoku zahříváním. Jelikož byla data uvedená v této kapitole naměřená na hmotnostním spektrometru Waters Synapt G2Si s TWIMS, bylo nutné pro porovnání kolizních průřezů mezi jednotlivými nábojovými stavy provést nejprve kalibraci iontové mobility. Hmotnostní spektra pro jednotlivé vzorky a kolizní energie získaná při tomto experimentu jsou uvedena v *Příloze 2–6*.

### 4.3.1 Kalibrace iontové mobility

Pro logaritmickou kalibraci TWIMS [42] byly využity tři proteiny ( $\beta$ -laktoglobulin, cytochrom C a ubiquitin) a jejich různé nábojové stavy o známých kolizních průřezích v heliu pro pozitivní mód a nativní hmotnostní spektrometrii [37]. Během kalibrace byl užit přepočít z kolizních průřezů standardů v heliu pro kolizní průřezy analyzovaného vzorku v dusíku. Měření bylo provedeno v triplicátu a naměřené driftové časy pro jednotlivé proteiny byly shrnuty v Tab. 6.

**Tabulka 6** Kalibrace TWIMS iontové mobility. Uvedeny jsou standardy, jejich relativní molekulové hmotnosti a pro jednotlivé nábojové stavy  $m/z$ , kolizní průřezy v heliu a naměřené „drift time“. Kolizní průřezy převzaty z [42].

Standard	M [Da]	z	m/z	CCS v He [Å <sup>2</sup> ]	dt [ms]
<b>bLG dimer</b>	37 000	11	3340	2850	17,188
					17,178
					17,195
		12	3062	2900	15,112
					15,109
					15,114
<b>bLG monomer</b>	18 000	13	2826	2960	13,675
					13,681
					13,677
		7	2624	1660	14,366
					14,374
					14,374
<b>Cyt C</b>	12 000	8	2296	1690	11,804
					11,808
					11,808
		9	2040	1780	13,675
					13,681
					13,677
<b>UBQ</b>	8 600	6	2061	1240	11,056
					11,057
					11,037
		7	1767	1280	9,008
					9,030
					8,969
<b>UBQ</b>	8 600	4	2121	972	14,385
					14,400
					14,397
		5	1714	983	9,753
					9,748
					9,749
<b>UBQ</b>	8 600	6	1429	1000	7,455
					7,481
					7,485

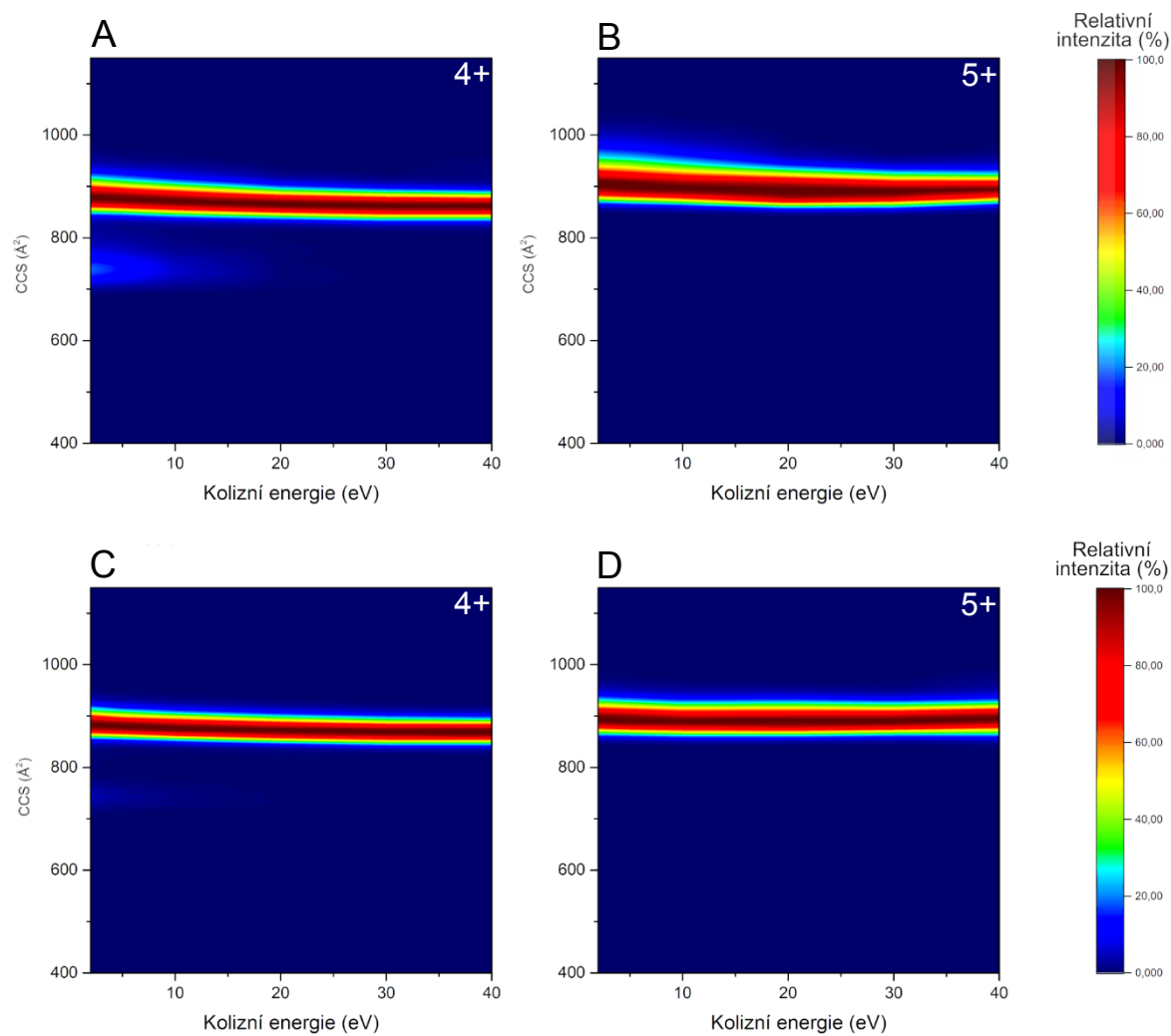
### 4.3.2 Kolizně indukované rozbalování (CIU)

V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané aktivací vzorku v kolizní cele srážkami s inertním plynem, jedná se tak o aktivaci analyzovaných molekul v plynné fázi. Výsledky jsou prezentovány formou tzv. teplotních map též nazývaných „heat mapy“. Jedná se o grafy, ve kterých je pro zobrazení třetího rozměru (osy z) užita barevná škála. Na ose x je vynesena zvyšující se kolizní energie, na ose y kolizní průřez (CCS) určený pomocí kalibrace popsané v kapitole 4.3.1 *Kalibrace iontové mobility*. V oblasti grafu je relativní intenzita znázorněna barevným gradientem od modré k červené.

#### 4.3.2.1 Dvouvláknová DNA (*C-MYC enhancer* a *C-MYC exon*)

U kolizní aktivace dsDNA, znázorněné pomocí teplotních map na *Obr. 20 na str. 52*, nebylo pozorováno kolizně indukované rozbalování ani u jedné z analyzovaných dsDNA *C-MYC exon* a *C-MYC enhancer*.

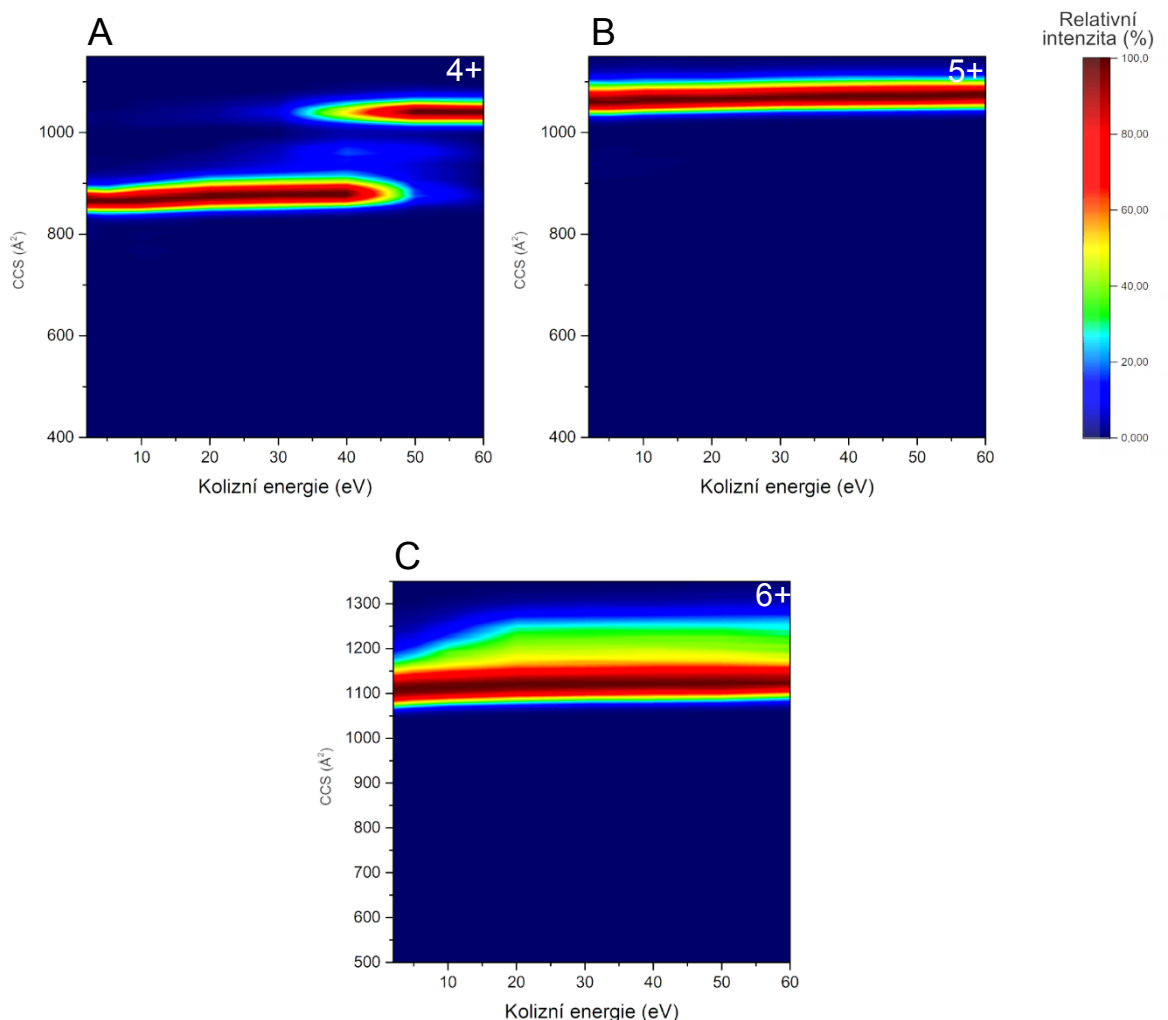
Pro dva pozorované nábojové stavy obou dsDNA byly pomocí kalibrace získány hodnoty kolizních průřezů. Naměřené hodnoty pro kolizní energie 30 eV byly proloženy Gaussovou křivkou, jejímu maximu odpovídají uvedené hodnoty CCS (příklad proložení viz mobiliogramy v *Příloze 7*). Pro *C-MYC exon* (*Obr. 20 na str. 52 A, B*) v nábojovém stavu 4+ odpovídal CCS  $860 \text{ \AA}^2$  a pro 5+  $890 \text{ \AA}^2$ . Pro *C-MYC enhancer* (*Obr. 20 na str. 52 C, D*) pak pro 4+  $870 \text{ \AA}^2$  a 5+  $890 \text{ \AA}^2$ . Z teplotních map a kolizních průřezů obou dsDNA je patrné, že *C-MYC exon* i *C-MYC enhancer* vykazovaly při kolizní aktivaci stejné chování. Při zvyšování kolizní energie nedošlo k rozbalování dvouvláknové DNA, jelikož byly kolizní průřezy totožné v celém rozsahu měřených kolizních energií. Z nábojových stavů 4+ a 5+ pro *C-MYC enhancer* i *C-MYC exon* vyplývá, že získaný kolizní průřez není nábojovým stavem molekul výrazně ovlivněn.



**Obrázek 20** Teplotní mapy znázorňující závislost CCS ( $\text{\AA}^2$ ) na kolizní energii (2-40 eV) pro dvouvláknové DNA, C-MYC exon (A, B) a C-MYC enhancer (C, D). Obrázky A a C odpovídají nábojovému stavu 4+, zatímco B a D nábojovému stavu 5+.

#### 4.3.2.2 Protein TEAD1-DBD

Při kolizní aktivaci proteinu TEAD1-DBD bylo pozorováno kolizně indukované rozbalování. Pouze u nábojového stavu 4+ vedlo zvýšení kolizní energie zhruba z 30 na 40 eV k nárůstu CCS, jak je patrné z teplotních map uvedených na *Obr. 21 A*.



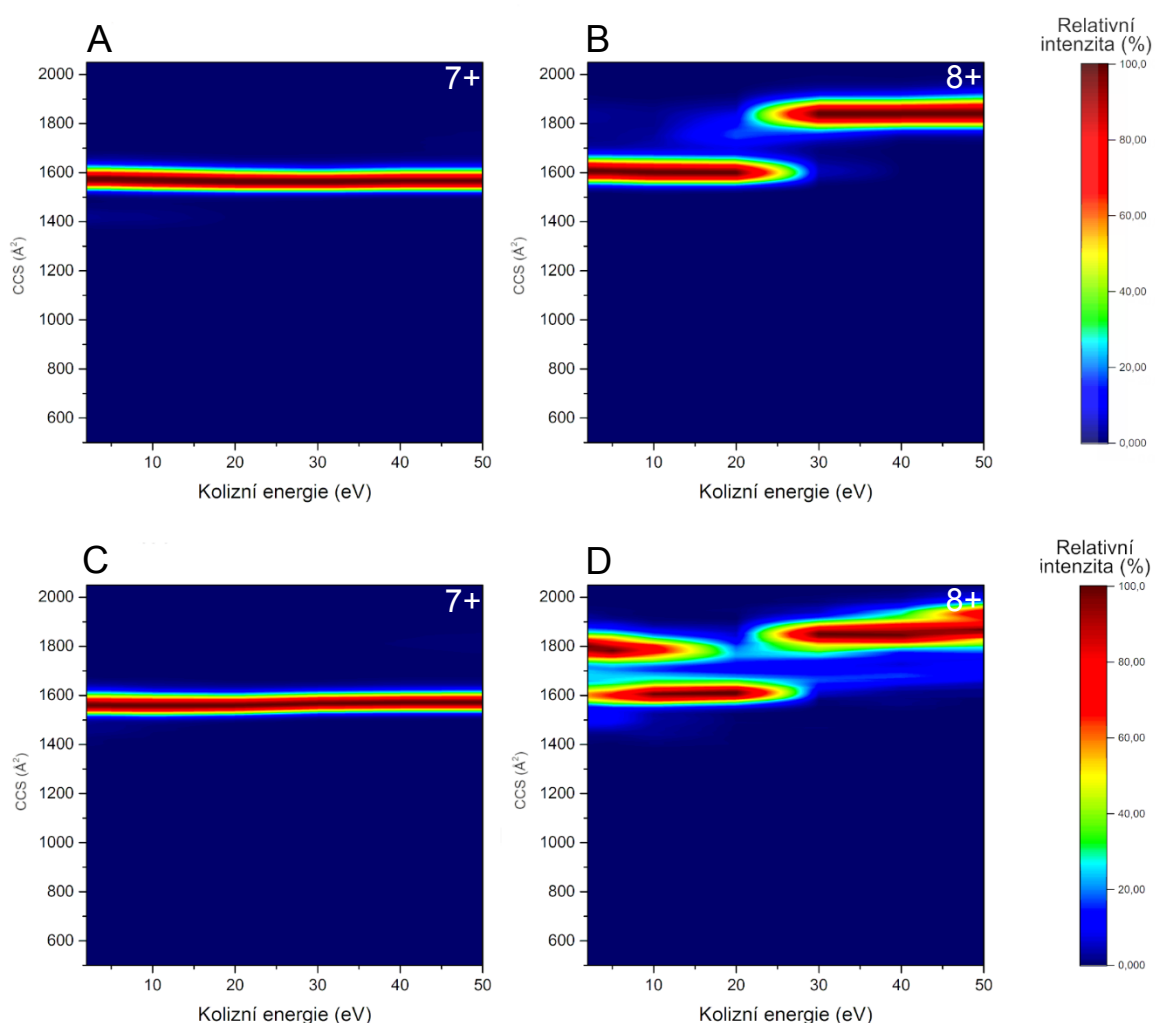
**Obrázek 21** Teplotní mapy znázorňující závislost kolizního průřezu ( $\text{\AA}^2$ ) na kolizní energii (2-60 eV). Uvedeny teplotní mapy pro jednotlivé nábojové stavy proteinu TEAD1-DBD: **A** 4+, **B** 5+ a **C** 6+.

Stejně, jak již bylo popsáno výše, byly pro všechny tři nábojové stavy z *Obr. 21* určeny kolizní energie proložením Gaussovou křivkou pro kolizní energii 40 eV. Pro nábojový stav 4+ byly užity dvě Gaussovy křivky reprezentující základní a kolizně rozbalenou formu proteinu. Maximum první Gaussovy křivky odpovídalo koliznímu průřezu  $880 \text{ \AA}^2$ , pro druhou křivku pak koliznímu průřezu  $1040 \text{ \AA}^2$ . Nábojovému stavu 5+ odpovídá CCS  $1070 \text{ \AA}^2$ . Pro nábojový stav 6+ byly využity dvě Gaussovy křivky odpovídající

kolizním průřezům 1120 a 1190 Å<sup>2</sup>. Na rozdíl od dsDNA, kde nebyly patrné výrazné změny v CCS mezi nábojovými stavy, je u proteinu patrný trend zvětšování kolizního průřezu se zvyšujícím se nábojovým stavem od 880 Å<sup>2</sup> pro základní stav 4+ až po 1190 Å<sup>2</sup> pro 6+.

#### 4.3.2.3 Komplexy TEAD1-DBD s dvouvláknovou DNA

Při kolizní aktivaci TEAD1-DBD komplexů s dsDNA, jak je znázorněno na *Obr. 22*, došlo ke kolizně indukovanému rozbalování, obdobně, jako bylo pozorováno pro protein TEAD1-DBD na *Obr. 21 na str. 53*. Ke kolizně indukovanému rozbalování došlo pro oba protein–DNA komplexy (s *C-MYC* exonem i *C-MYC* enhancerem) u nábojového stavu 8+ při zvýšení kolizní energie z 20 na 30 eV.



**Obrázek 22** Teplotní mapy znázorňující závislost kolizního průřezu na kolizní energii (2-50 eV). Uvedeny teplotní mapy pro komplexy proteinu TEAD1-DBD s *C-MYC* exonem **A** 7+ a **B** 8+ a TEAD1-DBD s *C-MYC* enhancerem **C** 7+ a **D** 8+.

Pro všechny nábojové stavy, uvedené na *Obr. 22 na str. 54*, byly určeny kolizní průřezy proložením experimentálních hodnot Gaussovou křivkou. U komplexu proteinu s *C-MYC* exonem byly určeny CCS při kolizní energii 30 eV. Pro nábojový stav 7+ odpovídal kolizní průřez  $1560 \text{ \AA}^2$  (*Obr. 22 A na str. 54*), pro nábojový stav 8+ (*Obr. 22 B na str. 54*) bylo užito proložení dvěma Gaussovými křivkami odpovídajícími CCS  $1610 \text{ \AA}^2$  pro základní stav a  $1840 \text{ \AA}^2$  pro kolizně rozbalený stav komplexu. Pro komplex proteinu TEAD1-DBD s *C-MYC* enhancerem byly určeny CCS pro kolizní energii 20 i 30 eV. Nábojovému stavu 7+ byl přiřazen kolizní průřez  $1570 \text{ \AA}^2$  (30 eV) (*Obr. 22 C na str. 54*). Pro nábojový stav 8+ bylo nutné užít proložení třemi Gaussovými křivkami, kde byl pro základní stav určen CCS  $1610 \text{ \AA}^2$  (kolizní energie 20 eV) a pro kolizně rozbalený stav  $1860 \text{ \AA}^2$  (pro 20 i 30 eV) (*Obr. 22 D na str. 54*).

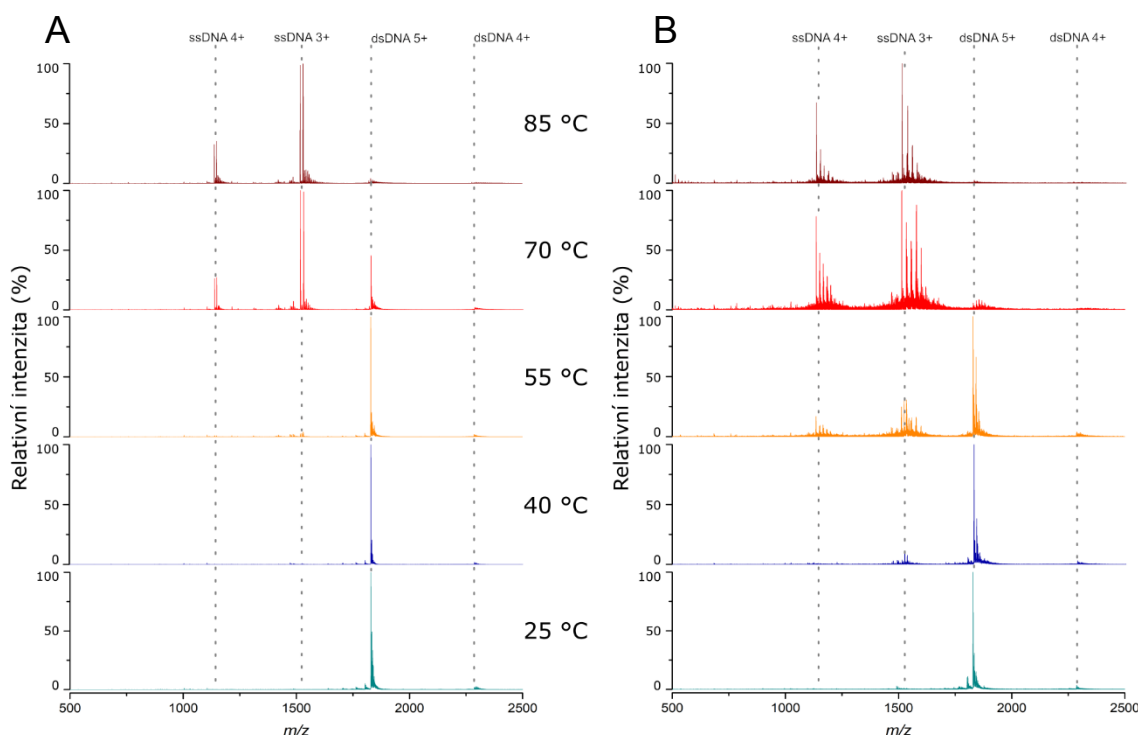
U obou protein DNA komplexů nebyla pozorována výrazná změna kolizních průřezů se zvyšujícím se nábojovým stavem. Z hodnot kolizních průřezů je patrné, že si nábojové stavy 7+ obou komplexů (TEAD1-DBD s *C-MYC* exonem i *C-MYC* enhancerem) svým kolizním průřezem  $1610 \text{ \AA}^2$  odpovídají, což je patrné i z porovnání teplotních map (*Obr. 22 A a C na str. 54*). Pro nábojový stav 8+ byla též pozorována podobnost mezi oběma komplexy, jelikož CCS základních stavů obou komplexů jsou totožné. Následně při zvýšení kolizní energie z 20 na 30 eV došlo u obou komplexů ke kolizně indukovanému rozbalení a CCS obou aktivovaných komplexů jsou téměř shodné.

### 4.3.3 Zahřívání sprejovaného roztoku

V této kapitole naleznete shrnutí výsledků získaných druhou aktivací, která byla provedena zahříváním sprejovaného roztoku pomocí vyhřívaného měděného těla (viz *Obr. 12 na str. 41*). Při aktivaci vzorku zahříváním sprejovaného roztoku docházelo k perturbaci v kapalně fázi, tedy ještě před ionizací. Data získaná tímto měřením jsou dále prezentována formou teplotních map a hmotnostních spekter pro vybrané teploty, na které byl vzorek zahříván. Dále jsou též uvedeny tavicí křivky, které graficky znázorňují změny vzorku při této aktivaci.

#### 4.3.3.1 Dvouvláknová DNA (*C-MYC enhancer* a *C-MYC exon*)

Při zahřívání roztoků vzorků s dvouvláknovou DNA bylo pozorováno tzv. tavení DNA, tedy rozpad dvouvláknové DNA na jednovláknovou, jak je patrné z *Obr. 23*. Při teplotě 25 °C byl pro obě dsDNA (*C-MYC enhancer* i *C-MYC exon*) v hmotnostním spektru nejvýraznější signál odpovídající dsDNA, zatímco signál pro ssDNA nebyl patrný. Při zvyšující se teplotě docházelo k poklesu signálů dsDNA doprovázeného nárůstem intenzity signálu ssDNA. Při teplotě 85 °C jsou v hmotnostních spektrech obou vzorků patrné pouze signály patřící ssDNA.



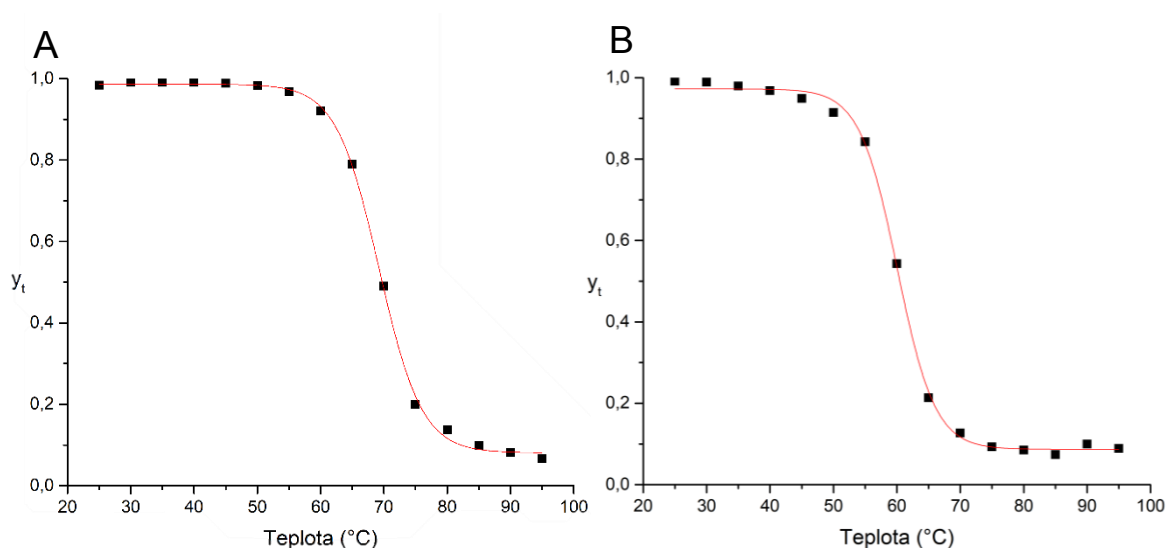
**Obrázek 23** Hmotnostní spektra ilustrující průběh tavení dsDNA (**A** *C-MYC exon*, **B** *C-MYC enhancer*). Uvedená hmotnostní spektra byla změřena při teplotách sprejovaného roztoku 25, 40, 55, 70 a 85 °C.



Pro stanovení bodu tavení dsDNA byly sestaveny křivky tavení vypočtením poměru  $y_T$  dle rovnice (2) pro jednotlivé teploty v rozsahu 25-95 °C s krokem po 5 °C. Nejprve byla pomocí algoritmu Savitzky-Golay vyhlazena hmotnostní spektra pro každou z teplot. Následně byly sečteny relativní intenzity v maximu pro dva nejintenzivnější nábojové stavy dsDNA či ssDNA. Poměr  $y_T$  pro jednotlivé teploty, který odpovídá množství dvouvláknové DNA vztažené k veškeré DNA ve vzorku, byl ze součtu intenzit vypočten jako:

$$y_T = \frac{I_{dsDNA}}{I_{dsDNA} + \frac{I_{ssDNA f} + I_{ssDNA r}}{2}}, \quad (2)$$

kde  $I_{dsDNA}$  a  $I_{ssDNA f/r}$  značí součet relativních intenzit dvou nejintenzivnějších nábojových stavů dvouvláknové DNA, potažmo f či r jednovláknové DNA. Poměr  $y_T$  nabývá hodnot mezi 0 a 1, kdy 1 znamená, že je veškerá přítomná DNA ve formě dsDNA. Naopak 0 vyjadřuje, že v hmotnostním spektru nebyl signál odpovídající dsDNA. Takto vypočtené hodnoty  $y_T$  byly vyneseny do grafu v závislosti na teplotě viz *Obr. 24 A* pro *C-MYC* exon a *B* pro *C-MYC* enhancer.

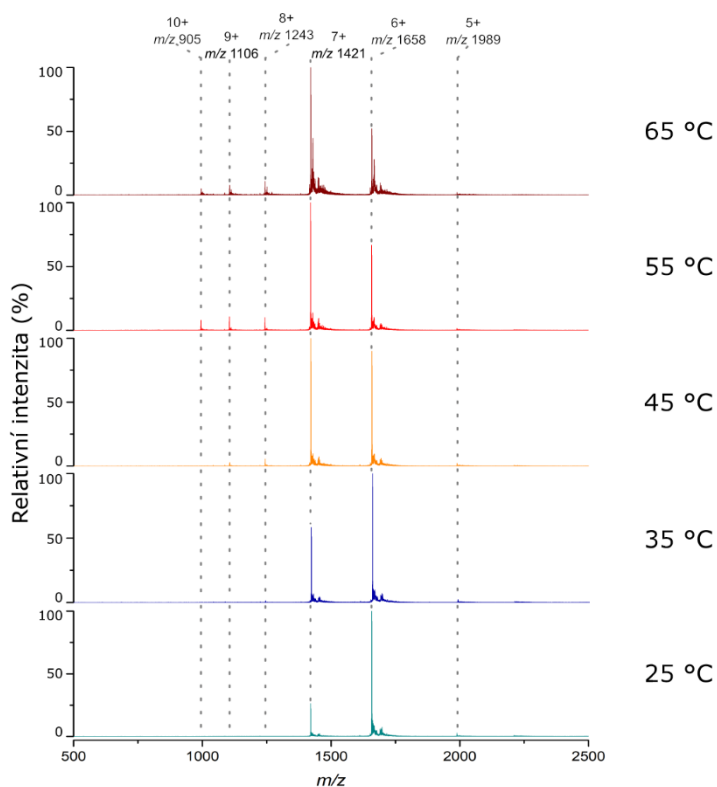


**Obrázek 24** Křivky tavení pro DNA oligonukleotidy **A** *C-MYC* exon **B** *C-MYC* enhancer. Vyneseny závislosti  $y_T$ , vypočtené dle rovnice (2), na teplotě (°C). Body proloženy sigmoidní Boltzmannovou křivkou a určeny inflexní body:  $T_{TA}=69$  °C a  $T_{TB}=60$  °C.

Vypočtené hodnoty vynesené do grafu v *Obr. 24* byly proloženy Boltzmannovou sigmoidní křivkou, jejíž inflexní bod odpovídá bodu tavení dané dvouvláknové DNA. Pro *C-MYC* exon byla teplota tavení stanovena jako 69 °C a pro *C-MYC* enhancer 60 °C.

#### 4.3.3.2 Protein TEAD1-DBD

Při zahřívání sprejovaného roztoku proteinu TEAD1-DBD byla se zvyšující se teplotou zaznamenána změna v distribuci nábojových stavů, jak je patrné z *Obr. 25*. Při teplotě 25 °C patřil nejvyšší pík v hmotnostním spektru nábojovému stavu 6+. Při teplotě 45 °C byl nejintenzivnější signál patřící nábojovému stavu 7+, stejně tomu bylo i při teplotách 55 a 65 °C, přičemž se zvyšující se teplotou stále klesala intenzita píku pro nábojový stav 6+. Naopak docházelo ke vzrůstu intenzity píku odpovídajícím vyšším nábojovým stavům 8+, 9+ a 10+.

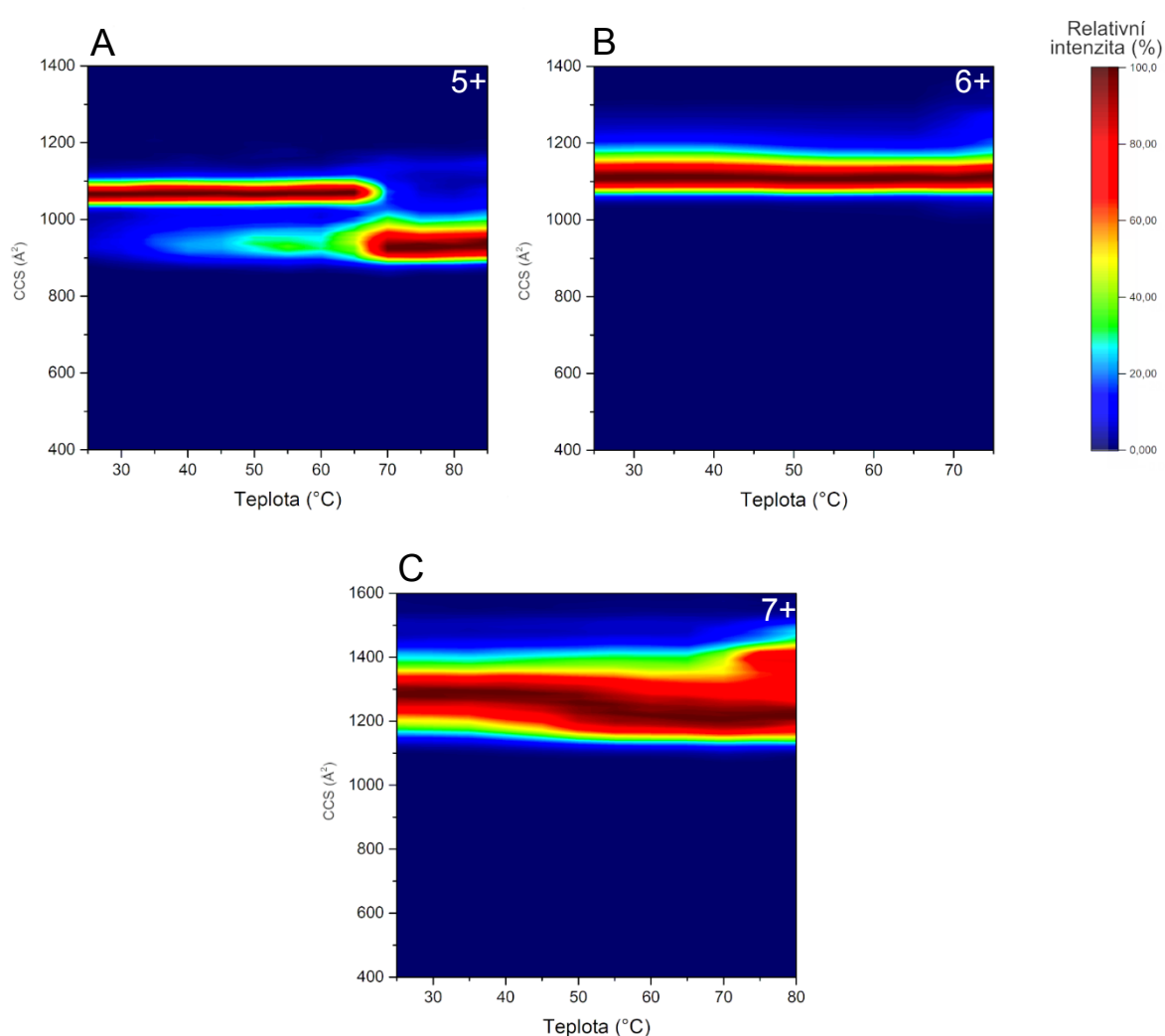


**Obrázek 25** Hmotnostní spektra ilustrující průběh zahřívání sprejovaného roztoku proteinu TEAD1-DBD. Uvedená hmotnostní spektra byla změřena při teplotách sprejovaného roztoku 25, 35, 45, 55 a 65 °C.

Při této aktivaci proteinu byly též zaznamenány změny v kolizích průřezech pro některé z nábojových stavů proteinu TEAD1-DBD, jak je znázorněno na teplotních mapách na *Obr. 26 na str. 59*. Proto byly pomocí proložení Gaussovou křivkou určeny kolizní průřezy pro nábojové stavy proteinu z *Obr. 26 na str. 59* při teplotě 65°C. U nábojového stavu 5+ (*Obr. 26. A na str. 59*) došlo postupným zahříváním ke snížení kolizního průřezu z 1070 Å<sup>2</sup> na 940 Å<sup>2</sup>. Pro nábojový stav 6+ byl určen CCS 1110 Å<sup>2</sup>, který se při zahřívání neměnil. U nábojového stavu 7+ byly pro proložení užity dvě

Gaussovy křivky odpovídající koliznímu průřezu  $1200 \text{ Å}^2$  a  $1300 \text{ Å}^2$ , avšak z *Obr. 26 C* je patrné, že se zahříváním docházelo ke změnám v CCS.

Dále byly pro nábojové stavy 8+, 9+ a 10+ při teplotě  $55 \text{ °C}$  (viz hmotnostní spektra na *Obr. 25 na str. 58*) též určeny kolizní průřezy (mobiliogramy v *Příloze 7*). Pro nábojový stav 8+ bylo nutné použít čtyři Gaussovy křivky odpovídající CCS  $1450 \text{ Å}^2$ ,  $1540 \text{ Å}^2$ ,  $1610 \text{ Å}^2$  a  $1690 \text{ Å}^2$ . U nábojového stavu 9+ byly určeny kolizní průřezy  $1610 \text{ Å}^2$  a  $1760 \text{ Å}^2$ , pro nábojový stav 10+ pak  $1870 \text{ Å}^2$ . Z uvedených výsledků je patrný trend zvyšování kolizního průřezu s rostoucím nábojovým stavem proteinu TEAD1-DBD.

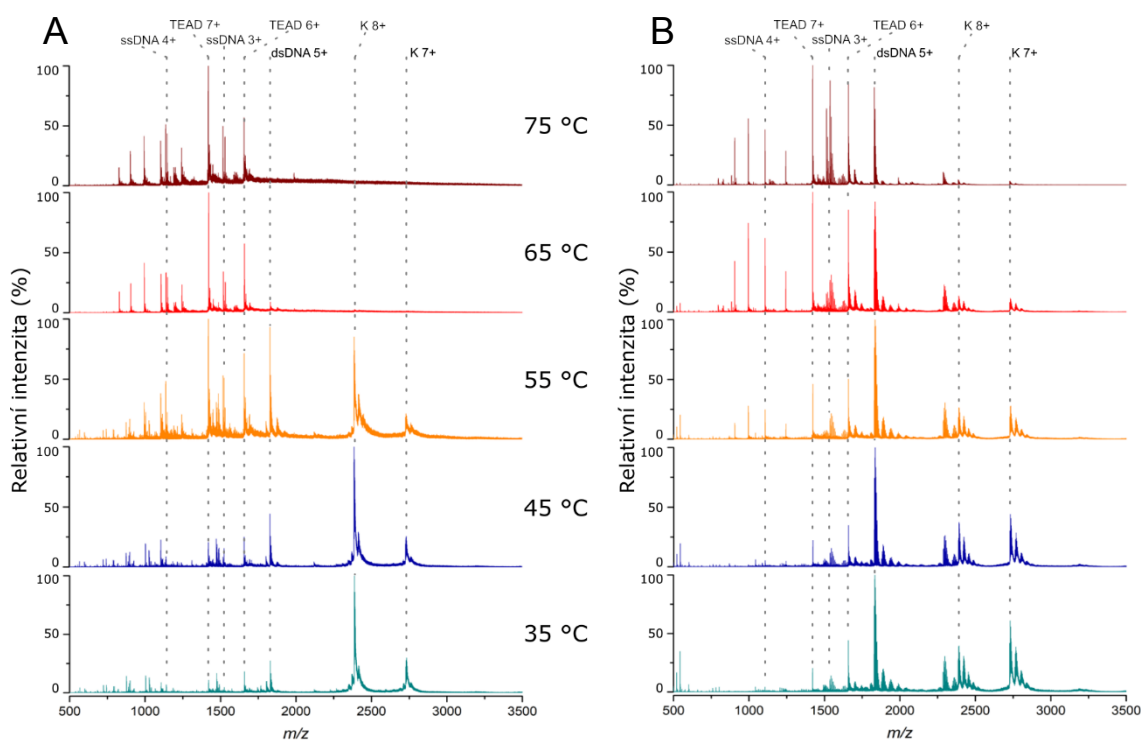


**Obrázek 26** Teplotní mapy znázorňující závislost CCS na teplotě ( $25\text{--}60 \text{ °C}$ ). Uvedeny teplotní mapy pro nábojové stavy proteinu TEAD1-DBD: **A** 5+, **B** 6+ a **C** 7+.

#### 4.3.3.3 Komplexy TEAD1-DBD s dvouvláknovou DNA

Při aktivaci TEAD1-DBD komplexů s dsDNA zahříváním roztoku byl se zvyšující se teplotou pozorován rozpad protein–DNA komplexů, jak vyplývá z *Obr. 27*. U komplexu proteinu s *C-MYC* exonem na *Obr. 27 A* patřil při teplotě 25 °C nejintenzivnější pík komplexu. Se vzrůstající teplotou došlo k nárůstu intenzity píku patřícímu proteinu a dvouvláknové DNA (teplota 55 °C), která se následně se zvyšující teplotou rozpadla na ssDNA.

Z dat naměřených pro komplex TEAD1-DBD s *C-MYC* enhancerem na *Obr. 27 B* je patrné, že při teplotě 25 °C patřil, na rozdíl od komplexu s *C-MYC* exonem, nejintenzivnější pík dvouvláknové DNA. Se zvyšující se teplotou tak byl pozorován úbytek relativní intenzity píků patřících komplexu a dsDNA, a naopak nárůst intenzity píků patřícím proteinu TEAD1-DBD a jednovláknové DNA, stejně jako bylo pozorováno u komplexu s *C-MYC* exonem na *Obr. 27 A*.

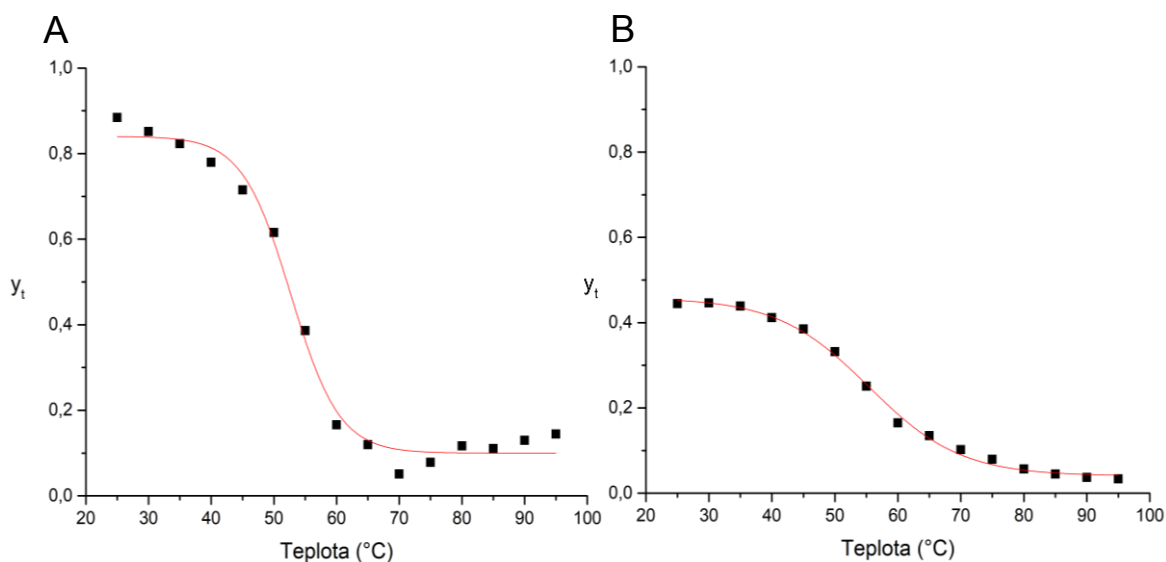


**Obrázek 27** Hmotnostní spektra popisující průběh tavení TEAD1-DBD komplexů s dsDNA **A** *C-MYC* exon **B** *C-MYC* enhancer. Uvedená hmotnostní spektra byla změřena při teplotách sprejovaného roztoku 35, 44, 55, 65 a 75 °C.

Pro stanovení teploty tavení jednotlivých komplexů byl použit podobný postup, který byl popsán v kapitole 4.3.3.1 *Dvouvláknová DNA*. Nejprve byla hmotnostní spektra pro teploty 25-95 °C vyhlazena pomocí algoritmu Savitzky-Golay a následně byla sečtena maxima relativní intenzity tří nejzastoupenějších nábojových stavů komplexu, dsDNA, ssDNA či proteinu. Z takto získaných hodnot byl vypočten poměr  $y_T$  jako:

$$y_T = \frac{I_K}{I_K + \frac{I_{dsDNA}}{2} + \frac{I_T}{2} + \frac{I_{ssDNA f}}{4} + \frac{I_{ssDNA r}}{4}}, \quad (3)$$

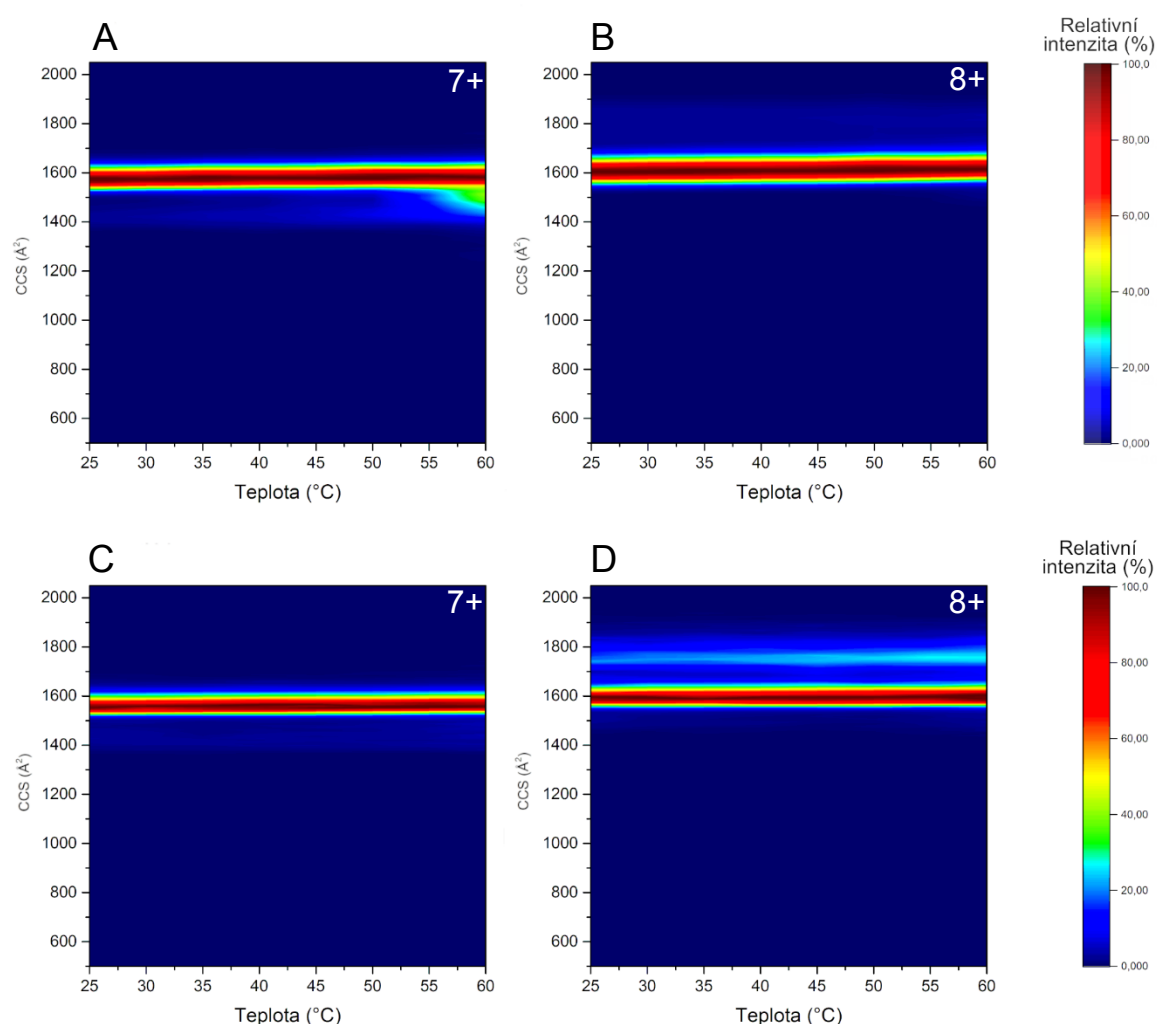
kde  $I_K$ ,  $I_T$ ,  $I_{dsDNA}$ ,  $I_{ssDNA f}$  a  $I_{ssDNA r}$  značí v uvedeném pořadí součet intenzit třech nejintenzivnějších píků nábojových stavů patřících: protein–DNA komplexu, proteinu TEAD1-DBD, dsDNA a oběma jednovláknovým DNA. Poměr  $y_T$  tak popisuje, kolik DNA a proteinu je vázáno ve formě komplexu a nabývá hodnot mezi 0 a 1. Hodnota  $y_T$  1 znamená, že v hmotnostním spektru nebyl signál odpovídající volné dsDNA či proteinu, naopak 0 značí nepřítomnost komplexu. Takto vypočtené poměry  $y_T$  byly vyneseny v závislosti na teplotě do grafu na Obr. 28 A pro komplex TEAD1-DBD s C-MYC exonem a B s C-MYC enhancerem.



**Obrázek 28** Křivky tavení TEAD1-DBD komplexů s DNA oligonukleotidy **A** C-MYC exon **B** C-MYC enhancer. Vyneseny závislosti  $y_T$ , vypočtené dle rovnice (3), na teplotě (°C). Body proloženy sigmoidní Boltzmannovou křivkou a určeny inflexní body:  $T_{TA}=55$  °C a  $T_{TB}=53$  °C.

Získané body byly proloženy Boltzmannovou sigmoidní křivkou a z jejího inflexního bodu určeny body tavení jednotlivých komplexů pro *C-MYC* exon jako 55 °C a *C-MYC* enhancer jako 53 °C. Z grafů je též patrné, že u komplexu s *C-MYC* enhancerem *Obr. 27 B na str. 60* bylo již při teplotě 25 °C větší množství volné DNA a proteinu, než tomu bylo u komplexu s *C-MYC* exonem *Obr. 28 A na str. 61*.

Při zahřívání sprejovaného roztoku nebyla ani u jednoho z nábojových stavů obou protein–DNA komplexů pozorována změna v kolizním průřezu, jak je patrné z teplotních map na *Obr. 29*. Pro oba komplexy byly určeny kolizní průřezy, pro komplex s *C-MYC* exonem 1580 Å<sup>2</sup> pro nábojový stav 7+ a 1620 Å<sup>2</sup> pro 8+. U komplexu s *C-MYC* enhancerem byly kolizní průřezy 1570 Å<sup>2</sup> pro nábojový stav 7+ a 1600 Å<sup>2</sup> pro 8+.



**Obrázek 29** Teplotní mapy znázorňující závislost CCS (Å<sup>2</sup>) na teplotě (25-60 °C). Uvedeny teplotní mapy pro nábojové stavy komplexů proteinu TEAD1-DBD s s *C-MYC* exonem **A** 7+ a **B** 8+ a TEAD1-DBD s *C-MYC* enhancerem **C** 7+ a **D** 8+.

## 5. DISKUZE

Proteiny z rodiny TEAD jsou cílovými efektory Hippo signální dráhy. Svou vazbou na sekvence dsDNA obsahující tzv. M-CAT element se tak významně podílí na řízení buněčných procesů, jako je diferenciacce či apoptóza [6]. Díky této funkci jsou nezbytné pro organismy, avšak jejich disregulace souvisí s onkologickými onemocněními [43], [44], což je patrně jedním z předních důvodů zájmu o tyto proteiny. Jednou z možností, jak ovlivnit transkripční aktivitu proteinů TEAD, a potažmo jejich roli v nádorových onemocněních, je modifikace regulační YBD domény [45]. Druhou z variant, jak ovlivnit transkripční aktivitu tohoto proteinu, je modifikovat jeho vazbu na DNA [6]. V této práci byla provedena rekombinantní exprese DNA-vazebné domény proteinu TEAD-1, jež byla následně studována především pomocí hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou.

Prvním z cílů této bakalářské práce byla rekombinantní exprese proteinu TEAD1-DBD, jež byla provedena dle protokolu používaného v naší laboratoři. Pro IM-MS analýzu bylo nutné získat vzorek ve vysoké čistotě, ale pro její účely nebylo třeba velkého množství. Proto byly do purifikačního protokolu zařazeny kroky jako druhá afinitní chromatografie a dialýza, díky kterým byl protein získán ve vysoké čistotě, ale za cenu snížení výtěžku.

Dalšími cíli práce bylo ověření schopnosti exprimovaného proteinu vázat dvouvláknovou DNA následované studiem proteinu a jeho komplexů s dsDNA. Pro účely této práce byly vybrány dvě dsDNA z exonu a enhanceru genu *C-MYC*. Obě použité dvouvláknové DNA, obsahují M-CAT vazebný motiv (sekvenci ATTCC), avšak v obrácené orientaci. U *C-MYC* exonu (5'-GTAGTAATTCCAGCG-3') se tento motiv nachází ve směru od 5' k 3', zatímco *C-MYC* enhanceru (5'-GCAATCCTTAAAGCT-3') od 3' k 5'. Ačkoliv je protein TEAD1-DBD schopný interagovat s M-CAT elementem v obou směrech, na větším vzorku dvouvláknových DNA obsahujících M-CAT element bylo ověřeno, že afinita proteinu je vyšší pro orientaci od 5' k 3' (*problematika studovaná v naší laboratoři, dosud nepublikované výsledky*). Rozdíl v afinitě proteinu TEAD1-DBD k jednotlivým dsDNA je možné pozorovat i na výsledcích uvedených v této práci. Porovnáním hmotnostních spekter pro oba komplexy (viz *Obr. 27 na str. 60, Obr. 19 na str. 49 a Přílohy 5 a 6*) bylo zjištěno, že u komplexu s *C-MYC* exonem patřil nejintenzivnější pík nábojovému stavu protein–DNA komplexu. Avšak v případě vzorku

komplexu s *C-MYC* enhancerem odpovídal nejintenzivnější signál dvouvláknové DNA a patrný byl i signál odpovídající volnému proteinu. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena již zmíněnou nižší afinitou DNA vazebné domény proteinu TEAD1 k M-CAT elementu v orientaci od 3' k 5' konci. S tímto faktem souhlasí i vypočtené poměry  $y_T$  pro oba komplexy při teplotě 25 °C (viz *Obr. 28 na str. 61*), kdy pro komplex s *C-MYC* exonem přesáhla hodnota 0,8, zatímco u komplexu s *C-MYC* enhancerem nedosáhla ani 0,5. Z toho vyplývá, že u vzorku obsahující TEAD1-DBD a *C-MYC* enhancer bylo výrazně větší množství nevázaných forem proteinu a dsDNA. Rozdíl v interakci proteinu s dsDNA ale nebyl pozorován při nativní elektroforéze (*Obr. 18 na str. 48*). Při stejné koncentraci proteinu a dsDNA (dráha 8 na obou gelech) byly pruhy odpovídající dsDNA velmi málo intenzivní a není mezi nimi patrný výrazný rozdíl, který by naznačoval vyšší afinitu proteinu k jedné z dvouvláknových DNA.

Z výsledků pro kolizní aktivaci proteinu TEAD1-DBD je patné, že se zvyšujícím se nábojovým stavem docházelo k zvětšování kolizního průřezu (viz *Obr. 21 na str. 53*). Pozorovaný jev byl již v minulosti popsán [39], přičemž byl pozorovaný nárůst kolizního průřezu přisuzován koliznímu rozbalování struktury proteinu. V námi provedeném experimentu došlo pro nábojový stav 4+ při zvýšení kolizní energie z 30 na 50 eV k přechodu ze základní formy proteinu (CCS 880 Å<sup>2</sup>) na druhou, aktivovanou, formu (CCS 1040 Å<sup>2</sup>). Z porovnání hodnot kolizního průřezu kolizně aktivované formy proteinu v nábojovém stavu 4+ a CCS nábojového stavu 5+ (CCS 1070 Å<sup>2</sup>) je možné usuzovat, že při kolizním rozbalení došlo k rozvolnění struktury proteinu odpovídajícímu nábojovému stavu 5+.

Při kolizní aktivaci protein–DNA komplexů bylo očekáváno, že by rozdílná afinita proteinu k dsDNA mohla ovlivňovat jejich stabilitu při CIU. Z naměřených hodnot je patné, že si nábojové stavy 7+ obou komplexů (*Obr. 21 A a C na str. 53*) svými kolizními průřezy, 1560 Å<sup>2</sup> pro komplex s *C-MYC* exonem a 1570 Å<sup>2</sup> pro komplex s *C-MYC* enhancerem, odpovídají. Ze získaných CCS je též patná podobnost mezi nábojovým stavem 7+ a základním stavem 8+, a to pro oba komplexy. U nábojového stavu 8+ došlo u komplexu s *C-MYC* exonem při kolizní energii mezi 20–30 eV ke kolizně indukovanému rozbalení (změna CCS z 1610 Å<sup>2</sup> na 1840 Å<sup>2</sup>). U komplexu s *C-MYC* enhancerem byl již při nízké kolizní energii patrný výskyt dvou forem komplexu s rozdílnými CCS (1610 Å<sup>2</sup> na 1860 Å<sup>2</sup>), které odpovídají základní a aktivované formě komplexu s *C-MYC* exonem. Při zvýšení kolizní energie z 20 na 30 eV pak došlo ke kolizně indukovanému rozbalení základního



stavu komplexu na CCS 1860 Å<sup>2</sup>. Jelikož u samotné dsDNA nebyla pozorována změna v kolizním průřezu ani pro jeden z oligonukleotidů (*Obr. 20 na str. 52*), je možné usuzovat, že za pozorované kolizně indukované rozbalování u komplexu byla odpovědná strukturní změna proteinu. Získané výsledky by též mohly naznačovat, že komplex s *C-MYC* exonem byl stabilnější, neboť u komplexu s *C-MYC* enhancerem byl pozorován kolizně rozbalený stav u nábojového stavu 8+ již při kolizní energii 2 eV. Pro lepší pochopení a interpretaci naměřených hodnot by bylo vhodné využít v budoucnu molekulární modelování [46], které by mohlo poskytnout teoretické hodnoty kolizních průřezů. Velmi zajímavé by bylo též srovnání výsledků získaných v pozitivním módu ionizace s měřeními v negativním módu ionizace [47].

Při druhém typu aktivace (zahřívání sprejovaného roztoku) byl pozorován rozpad dvouvláknové DNA na jednotlivé oligonukleotidy. Pro obě dsDNA byly pomocí této aktivace určeny teploty tavení, a to 60 °C pro *C-MYC* enhancer a 69 °C pro *C-MYC* exon. Pro porovnání správnosti získaných výsledků byl experiment tavení dsDNA proveden na PCR cycleru Mgr. Karlem Vališem, Ph.D. s výslednými teplotami tavení 59 °C pro *C-MYC* enhancer a 60 °C pro *C-MYC* exon. Patrný rozdíl mezi hodnotami získanými jednotlivými metodami může být způsoben několika faktory. Prvním z nich může být ochlazení roztoku ve špičce nESI kapiláry při IM-MS experimentu. K dalšímu ochlazování sprejovaného roztoku mohlo též dojít odpařováním sprejovaných kapek. Výše zmíněné jevy by bylo možné částečně eliminovat vyhříváním kapiláry předřazené vstupu do hmotnostního spektrometru, avšak zvýšená teplota tohoto prvku by mohla mít vliv na perturbaci molekul spojenou se změnami v jejich kolizním průřezu. Jedním z dalších možných zdrojů nepřesnosti je umístění nESI emiteru dále od vstupu do hmotnostního spektrometru či ionizace v pozitivním módu, jež není pro záporně nabitě nukleové kyseliny běžně užívána. Tyto zdroje chyb ale byly vyloučeny následným provedením stejného experimentu s nově připraveným vzorkem za použití negativního módu ionizace, který poskytl podobné výsledky pro obě dsDNA. Dalším možným zdrojem nepřesnosti výsledku je nutnost užití algoritmu pro vyhlazení hmotnostního spektra, aby bylo možné vypočítat poměry  $y_T$ . Jeho využití bylo nutné, neboť nebyla kvůli rozlišení hmotnostního spektrometru Waters Synapt G2 Si u všech nábojových stavů patrná izotopová obálka (u některých ano a u jiných ne), jejíž přítomnost by vyhodnocení výsledků značně usnadnila. Z výše uvedených důvodů by bylo vhodné provést stejný experiment s kompletním

vyhříváním (jak měděného těla, tak kapiláry) na hmotnostním spektrometru, který je schopen dosáhnout lepšího rozlišení, než je tomu u TOF analyzátoru.

Při perturbaci sprejovaného roztoku proteinu TEAD1-DBD zahříváním byla pozorována změna v distribuci nábojových stavů, kdy se zvyšující se teplotou docházelo k nárůstu relativní intenzity píků odpovídajících vyšším nábojovým stavům (*Obr. 25 na str. 57*). Jak bylo prokázáno výpočtem kolizních průřezů pro jednotlivé nábojové stavy, tato skutečnost pravděpodobně odpovídá tomu, že docházelo k postupnému rozbalování proteinu. Zvýšení intenzity píků s vyššími nábojovými stavy tak značí rozvolnění struktury proteinu, jež může značně souviset s jeho schopností tvořit komplexy. Též u některých nábojových stavů proteinu (7+ a 5+) byly pomocí IM-MS zaznamenány změny v kolizním průřezu naznačující změnu struktury, která by též mohla být odpovědná za neschopnost proteinu tvořit komplex s dsDNA. Z teplotní mapy (*Obr. 26 na str. 59*) pro nábojový stav 5+ je navíc patrné, že k této změně dochází částečně již při teplotě 50 °C, což koresponduje se stanovenými teplotami tavení komplexu. Je tudíž patrné, že strukturní změny proteinu zaznamenané při této aktivaci, mají nejspíše vliv na rozpad obou komplexů v důsledku zvyšující se teploty.

Při aktivaci zahříváním vzorku obsahujícího protein–DNA komplexy byly stanoveny teploty tavení, 55 °C pro komplex s *C-MYC* exonem a 53 °C pro komplex s *C-MYC* enhancerem, jež se na rozdíl od teplot tavení samotných dsDNA oligonukleotidů vzájemně výrazně neliší. Vypočtený rozdíl mezi teplotami tavení pro jednotlivé komplexy by mohl částečně souviset s nižší afinitou proteinu k *C-MYC* enhanceru, avšak tuto domněnku by bylo zajímavé ověřit pomocí jiné metody, jako např. diferenční skenovací fluorimetrie [48]. Kromě malého rozdílu v teplotě tavení mezi oběma protein DNA komplexy byl zaznamenán nárůst signálu dvouvláknové DNA se zvyšující se teplotou pro komplex s *C-MYC* exonem a postupná změna v distribuci nábojových stavů proteinu naznačující jeho rozvolňování se zvyšující se teplotou. Tyto skutečnosti napovídají, že se komplex při perturbaci zahříváním roztoku pravděpodobně rozpadá kvůli nižší teplotní stabilitě proteinu oproti dsDNA. Jak již bylo zmíněno výše, další informace by též mohlo poskytnout měření stejných vzorků v negativním módu [47].

Výsledky naměřené v bakalářské práci, získané pomocí dvou aktivací protein–DNA komplexů, vykazují některé společné rysy. Jak bylo nastíněno výše, kolizně indukované rozbalení, doprovázené nárůstem CCS u protein–DNA komplexů, je patrně zaviněno rozbalováním proteinu, nikoli CIU dsDNA. Tento fakt koresponduje s jevem pozorovaným

při tavení protein–DNA komplexů, kdy byl obzvláště u vzorku s *C-MYC* exonem se zvyšující se teplotou patrný nárůst signálu dsDNA, značící, že za rozpad komplexu pravděpodobně odpovídá strukturní změna proteinu. Tento jev byl navíc doprovázen změnami v distribuci nábojových stavů proteinu, což též naznačuje, že dochází k rozvolnění jeho struktury. Z výše popsaných důvodů je tudíž možné usuzovat, že k rozpadu či rozvolnění struktury protein–DNA komplexu dochází patrně díky strukturním změnám proteinu TEAD1-DBD, a to u obou aktivací, jak v plynné, tak v kapalně fázi. Mezi oběma aktivacemi byl pozorován i rozdíl. Z výsledků naměřených pro CIU obou komplexů, kde došlo ke kolizní aktivaci, bylo usuzováno, že by k podobnému jevu, tedy k rozbalování struktury protein–DNA komplexu, mohlo docházet i při tepelné perturbaci analyzovaných vzorků. Tento jev však nebyl pozorován a mohl by být způsoben tím, že při teplotní aktivaci v kapalně fázi došlo ke strukturní změně proteinu, která byla doprovázena rozpadem komplexu či neschopností perturbovaného proteinu komplex s dsDNA vytvořit. S touto domněnkou koresponduje fakt, že je při zahřívání sprejovaného roztoku patrný nárůst vyšších nábojových stavů proteinu značících jeho rozbalování (*Obr. 27 na str. 60*).

## 6. ZÁVĚR

Pro účely bakalářské práce byla provedena rekombinantní exprese DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 dle již zavedeného protokolu, s výtěžkem 1,1 mg proteinu v dostatečné kvalitě pro následnou IM-MS analýzu. Dále byla pomocí nativní elektroforézy a hmotnostní spektrometrie za použití nativní nESI ionizace ověřena schopnost proteinu vázat dvouvláknovou DNA. Následně byl exprimovaný protein TEAD1-DBD studován pomocí IM-MS za využití dvou aktivací. První z užitých aktivací byla kolizní aktivace (CIU) srážkami vzorku s inertním plynem v kolizní cele pro protein, dvě dvouvláknové DNA i dva protein dsDNA komplexy. Druhou z použitých aktivací byla perturbace vzorku zahříváním sprejovaného roztoku, která byla též použita pro protein, dvě dsDNA a dva protein dsDNA komplexy.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. M. Vaquerizas, S. K. Kummerfeld, S. A. Teichmann, N. M. Luscombe, „A census of human transcription factors: Function, expression and evolution", *Nature Reviews Genetics*, **10**:4, 252–263 (2009).
- [2] S. A. Lambert, A. Jolma, L. F. Campitelli, P. K. Das, Pratyush, Y. Yin, M. Albu, X. Chen, J. Taipale, T. R. Hughes, M. T. Weirauch, „The Human Transcription Factors", *Cell*, **172**: 4, 650–665 (2018).
- [3] S. Fietze, P. J. Farnham, „Transcription factor effector domains", *Subcell. Biochem.*, **52**, 261–277 (2011).
- [4] S. Boyadjiev, E. Jabs, „Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) as a knowledgebase for human developmental disorders", *Clinical Genetics*, **57**:4, 253–266 (2000).
- [5] S. J. Furney, D. G. Higgins, C. A. Ouzounis, N. López-Bigas, „Structural and functional properties of genes involved in human cancer", *BMC Genomics*, **7**:3 (2006).
- [6] J. K. Holden a C. N. Cunningham, „Targeting the hippo pathway and cancer through the TEAD family of transcription factors", *Cancers*, **10**:3 (2018).
- [7] D. Yesudhas, M. Batoo, M. A. Anwar, S. Panneerselvam, S. Choi, „Proteins recognizing DNA: Structural uniqueness and versatility of DNA-binding domains in stem cell transcription factors", *Genes*, **8**:8 (2017).
- [8] M. T. Weirauch, T. R. Hughes, *A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution*, Dordrecht, Springer, 2011.
- [9] D. S. Latchman, „Transcription factors: An overview", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**:12, 1305–1312 (1997).
- [10] P. F. Johnson, S. L. McKnight, „Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins", *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 799–839 (1989).
- [11] J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, „Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity", *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 39–46 (2001).
- [12] S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, „DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**:3, 183–212 (2000).
- [13] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, „Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å", *Science*, **252**:5007, 809–817 (1991).

- [14] C. R. Kissinger, B. Liu, E. Martin-Blanco, T. B. Kornberg, C. O. Pabo, „Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions", *Cell*, **63**:3, 579–590, (1990).
- [15] W. J. Gehring, Y. Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A. F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, K. Wüthrich, „Homeodomain-DNA recognition", *Cell*, **78**:2, 211–223 (1994).
- [16] S. Ma, Z. Meng, R. Chen, K. L. Guan, „The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology", *Annu. Rev. Biochem.*, **88**:1, 577–604 (2019).
- [17] C. L. Noland, S. Gierke, P. D. Schnier, J. Murray, W. N. Sandoval, M. Sagolla, A. Dey, R. N. Hannoush, W. J. Fairbrother, C. N. Cunningham, „Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling", *Structure*, **24**:1, 179–186 (2016).
- [18] A. Landin-Malt, A. Benhaddou, A. Zider, D. Flagiello, „An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors", *Gene*, **592**:1, 292–303 (2016).
- [19] Z. Shi, F. He, M. Chen, L. Hua, W. Wang, S. Jiao, Z. Zhou, „DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4", *Oncogene*, **36**:30, 4362–4369 (2017).
- [20] Z. Li, B. Zhao, P. Wang, F. Chen, Z. Dong, H. Yang, K. L. Guan, Y. Xu, „Structural insights into the YAP and TEAD complex", *Genes Dev.*, **24**:3, 235–240 (2010).
- [21] N. P. Lopes, R. R. da Silva, *Mass Spectrometry in Chemical Biology Evolving Applications*, London, Royal Society of Chemistry, 2017.
- [22] J. H. Gross, *Mass spectrometry: A textbook*. 2nd ed. Heidelberg, Springer, 2011.
- [23] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, „Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules", *Anal. Chem.*, **57**:14, 2935–2939 (1985).
- [24] C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen, H. L. Tai, „Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications.", *Clin. Biochem. Rev.*, **24**, 3–12 (2003).
- [25] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, „Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers", *Applied Spectroscopy Reviews*, **44**:3, 210–230 (2009).

- [26] A. C. Leney, A. J. R. Heck, „Native Mass Spectrometry: What is in the Name?", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **28**, 5–13 (2017).
- [27] L. Tang, P. Kebarle, „Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution", *Anal. Chem.*, **65**:24, 3654–3668 (1993).
- [28] M. C. Jecklin, D. Touboul, C. Bovet, A. Wortmann, R. Zenobi, „Which Electrospray-Based Ionization Method Best Reflects Protein-Ligand Interactions Found in Solution? A Comparison of ESI, nanoESI, and ESSI for the Determination of Dissociation Constants with Mass Spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**:3, 332–343 (2008).
- [29] M. S. Wilm, M. Mann, „Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last?", *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **136**:2–3, 167–180 (1994).
- [30] M. Wilm a M. Mann, „Analytical properties of the nanoelectrospray ion source", *Anal. Chem.*, **68**:1, 1–8 (1996).
- [31] M. Porrini, F. Rosu, C. Rabin, L. Darré, H. Gómez, M. Orozco, V. Gabelica, „Compaction of Duplex Nucleic Acids upon Native Electrospray Mass Spectrometry", *ACS Cent. Sci.*, **3**:5, 454–461 (2017).
- [32] A. J. R. Heck, „Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology", *Nat. Methods*, **5**:11, 927–933 (2008).
- [33] F. Lanucara, S. W. Holman, C. J. Gray, C. E. Eyers, „The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics", *Nat. Chem.*, **6**:4, 281–294 (2014).
- [34] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach, I. Gràcia, „Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current instrumentation", *Analyst*, **140**:5, 1376–1390 (2015).
- [35] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach, I. Gràcia, „Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 2: Hyphenated methods and effects of experimental parameters", *Analyst*, **140**:5, 1391–1410 (2015).
- [36] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill, „Ion mobility-mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.*, **43**:1, 1–22 (2008).
- [37] M. F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C. V. Robinson, B. T. Ruotolo, „Collision cross sections of proteins and their complexes: A calibration framework and database

- for gas-phase structural biology", *Anal. Chem.*, **82**:22, 9557–9565 (2010).
- [38] Y. Sun, S. Vahidi, M. A. Sowole, L. Konermann, „Protein Structural Studies by Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry: A Critical Look at Electrospray Sources and Calibration Issues", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **27**:1, 31–40 (2016).
- [39] S. M. Dixit, D. A. Polasky, B. T. Ruotolo, „Collision induced unfolding of isolated proteins in the gas phase: past, present, and future", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **42**, 93–100 (2018).
- [40] Růžena Lišková, „Rekombinantní příprava transkripčního faktoru TEAD", PřF UK, Praha, 2016.
- [41] J. L. Lippens, J. B. Mangrum, W. McIntyre, B. Redick, D. Fabris, „A simple heated-capillary modification improves the analysis of non-covalent complexes by Z-spray electrospray ionization", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **30**:6, 773–783 (2016).
- [42] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S. J. Hyung, C. V. Robinson, „Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes", *Nat. Protoc.*, **3**:7, 1139–1152 (2008).
- [43] D. Wang, J. He, J. Dong, T. F. Meyer, T. Xu, „The HIPPO pathway in gynecological malignancies", *Am. J. Cancer Res.*, **10**:2, 610–629 (2020).
- [44] K. F. Harvey, X. Zhang, D. M. Thomas, „The Hippo pathway and human cancer", *Nature Reviews Cancer*, **13**:4, 246–257 (2013).
- [45] A. V. Pobbati, X. Han, A. W. Hung, S. Weiguang, N. Huda, G. Y. Chen, C. B. Kang, C. S. B. Chia, X. Luo, W. Hong, A. Poulsen, „Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy", *Structure*, **23**:11, 2076–2086 (2015).
- [46] A. Politis, A. Y. Park, Z. Hall, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, „Integrative modelling coupled with ion mobility mass spectrometry reveals structural features of the clamp loader in complex with single-stranded DNA binding protein", *J. Mol. Biol.*, **425**:23, 4790–4801 (2013).
- [47] S. Hong, M. F. Bush, „Collision-Induced Unfolding Is Sensitive to the Polarity of Proteins and Protein Complexes", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **30**:11, 2430–2437, (2019).
- [48] L. Nouchikian, C. Lento, K. Donovan, R. Dobson, D. J. Wilson, „Comparing the Conformational Stability of Pyruvate Kinase in the Gas Phase and in Solution", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **31**:3, 685–692 (2020).

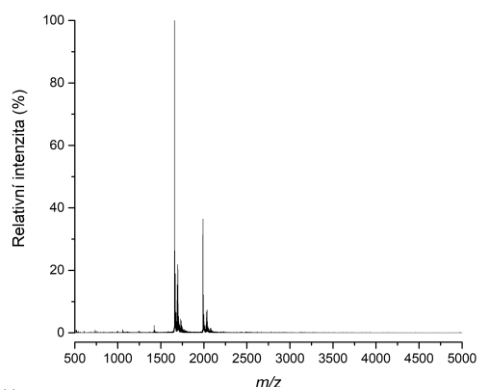


Příloha 1 – Shrnutí základních parametrů IM-MS měření

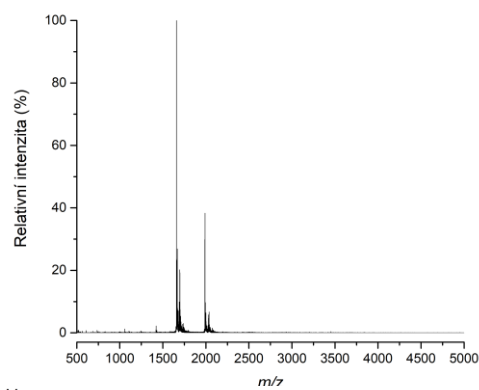
Ionizační mód:	Pozitivní (ES +)
Sprejovací napětí (v závislosti na konkrétním vzorku):	0,4-0,7 kV
Kolizní energie (v případě, že nebyla proměnná):	2 eV
Teplota předřazené kapiláry a iontového zdroje:	30 °C
„Sampling cone“:	10 V
Průtok plynu IMS:	60 ml/min
Rychlost IMS vlny:	750 m/s
Výška IMS vlny:	25,0 V
Tlak plynu v heliové cele:	3,41 mbar
Tlak plynu v IMS cele:	2,50 mbar

## Příloha 2 – Hmotnostní spektra z měření CIU proteinu TEAD1-DBD

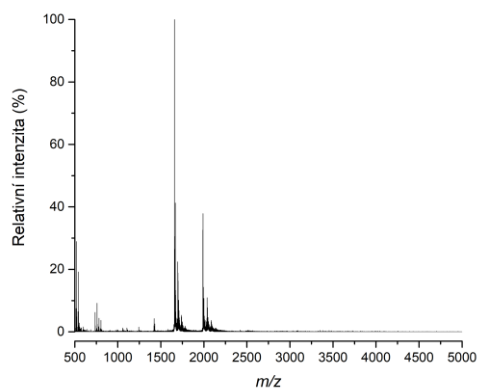
2 eV



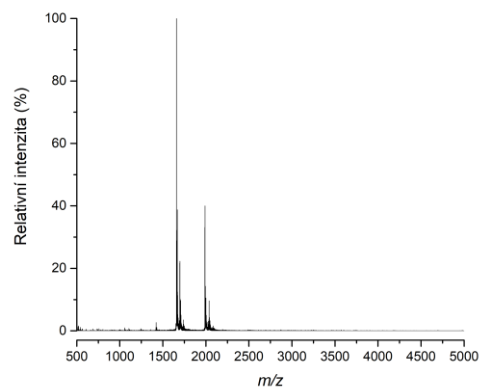
5 eV



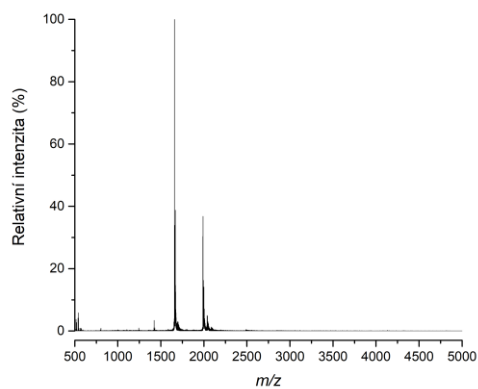
10 eV



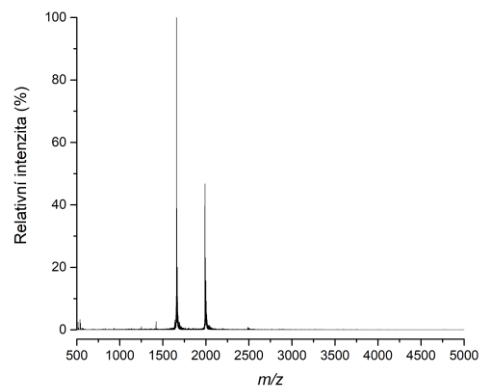
20 eV



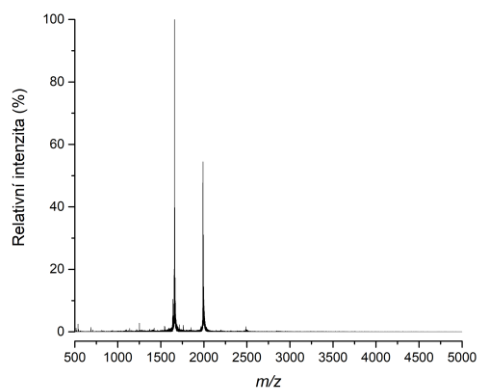
30 eV



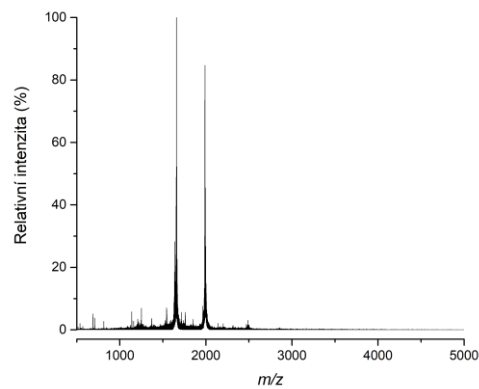
40 eV



50 eV

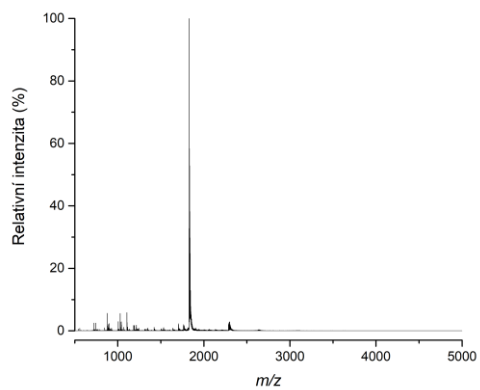


60 eV

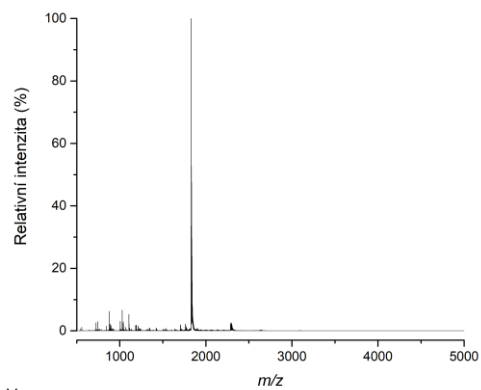


### Příloha 3 – Hmotnostní spektra z měření CIU pro *C-MYC* exon

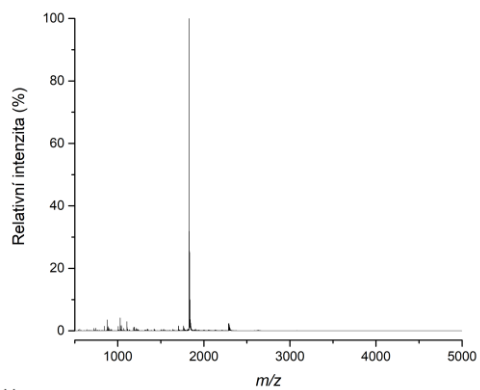
2 eV



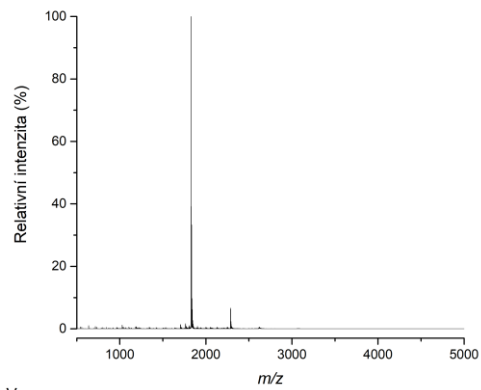
5 eV



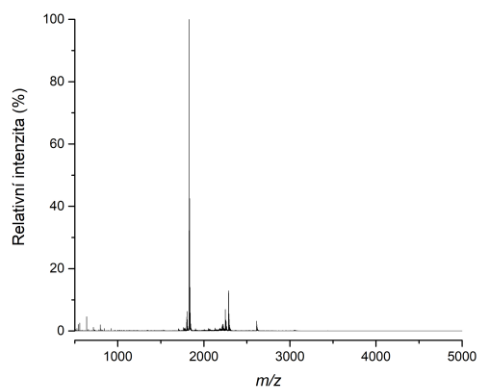
10 eV



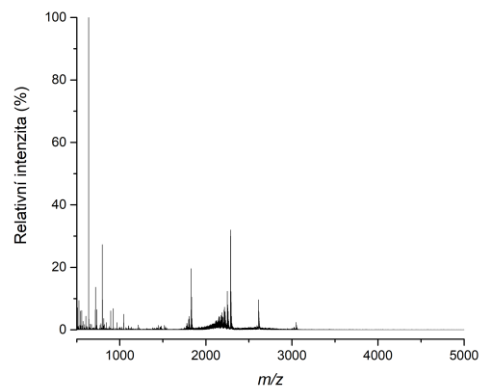
20 eV



30 eV

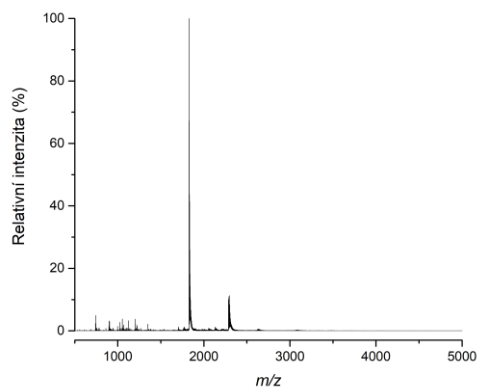


40 eV

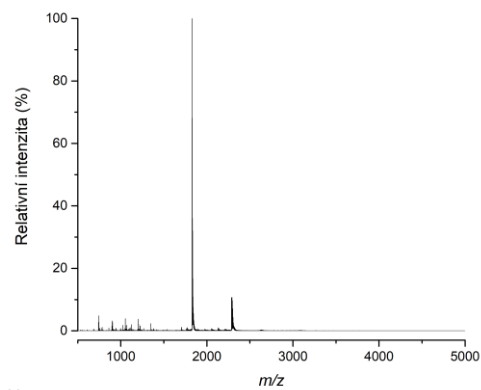


## Příloha 4 – Hmotnostní spektra z měření CIU pro *C-MYC* enhancer

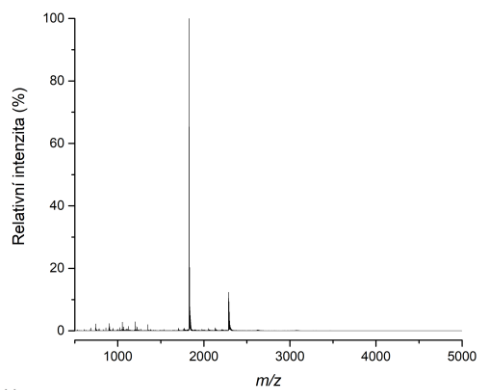
2 eV



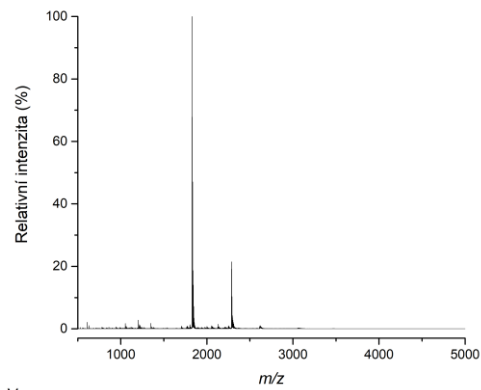
5 eV



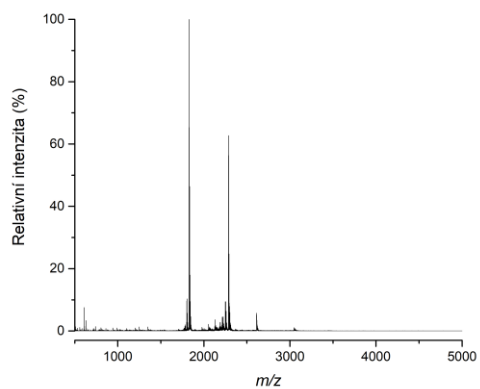
10 eV



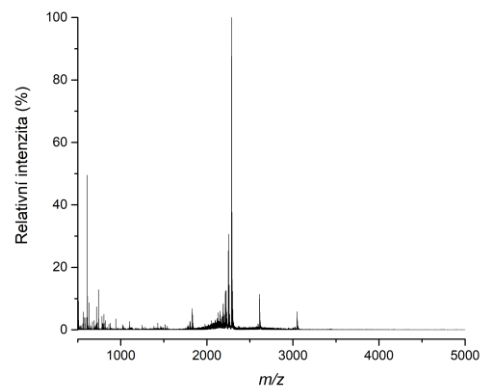
20 eV



30 eV

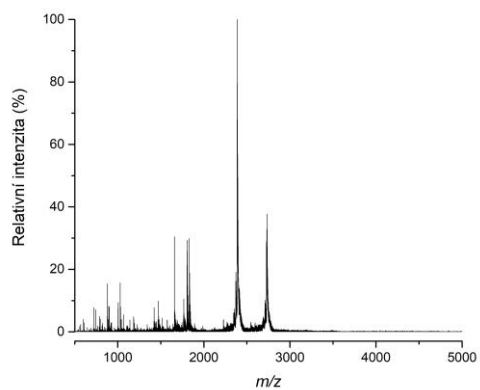


40 eV

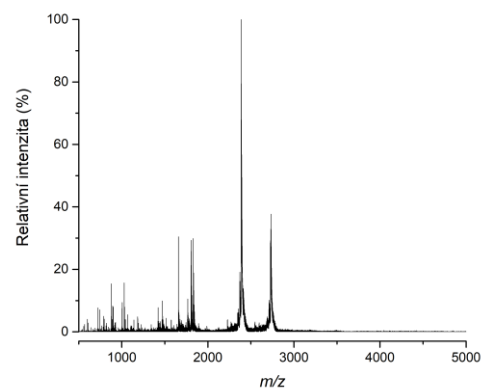


## Příloha 5 – Hmotnostní spektra z měření CIU pro komplex TEAD1-DBD *C-MYC* exon

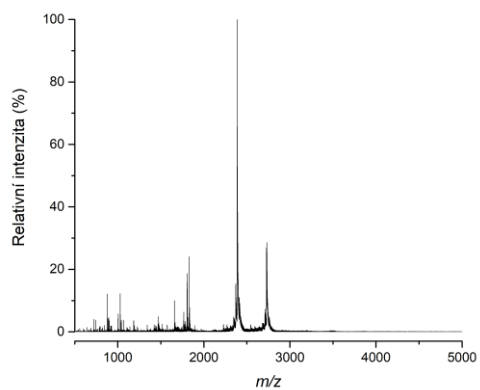
2 eV



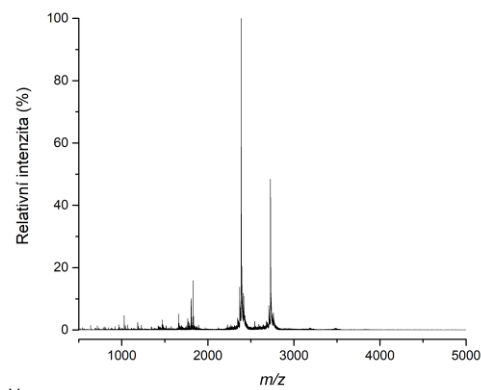
5 eV



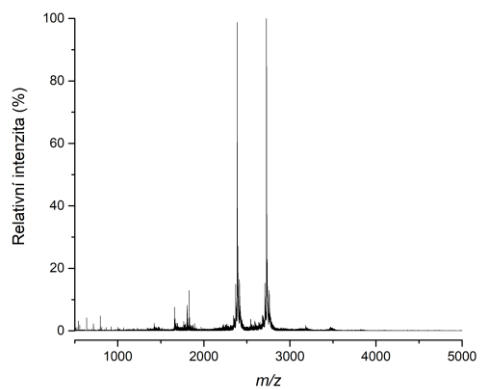
10 eV



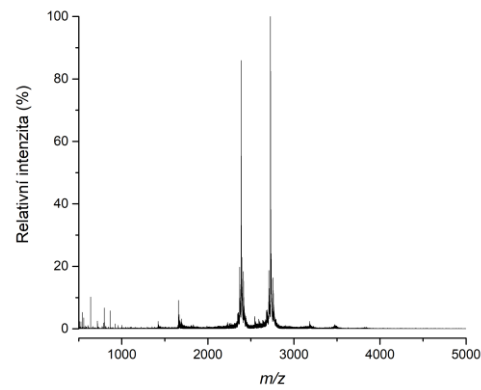
20 eV



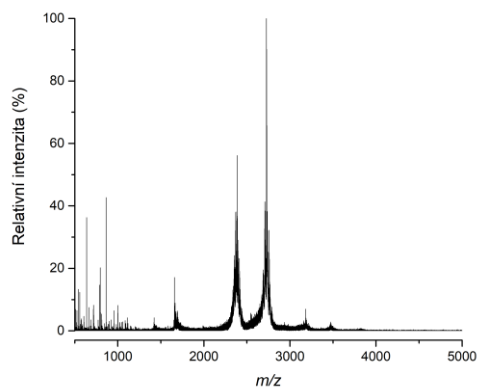
30 eV



40 eV

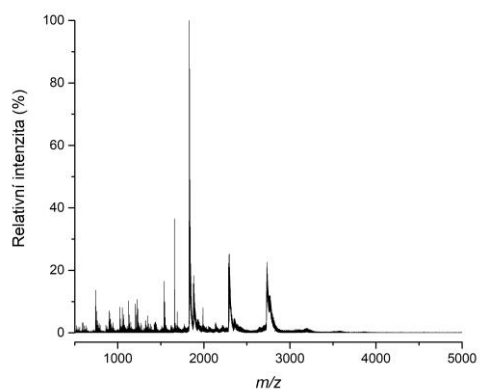


50 eV

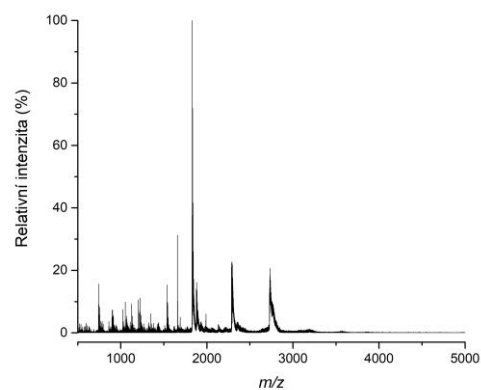


## Příloha 6 – Hmotnostní spektra z měření CIU pro komplex TEAD1-DBD *C-MYC* enhancer

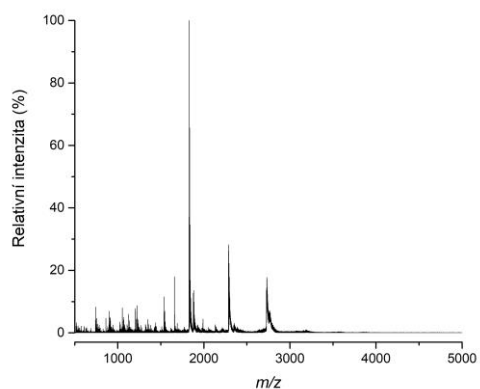
2 eV



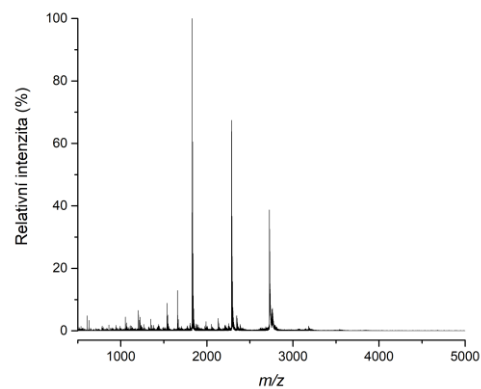
5 eV



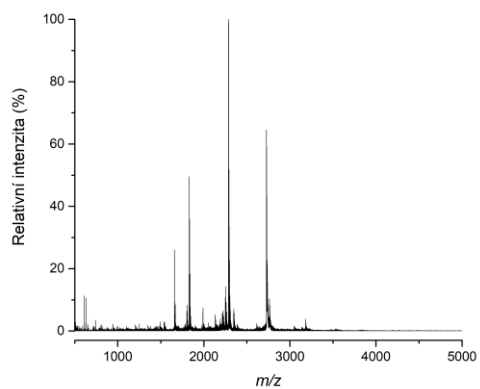
10 eV



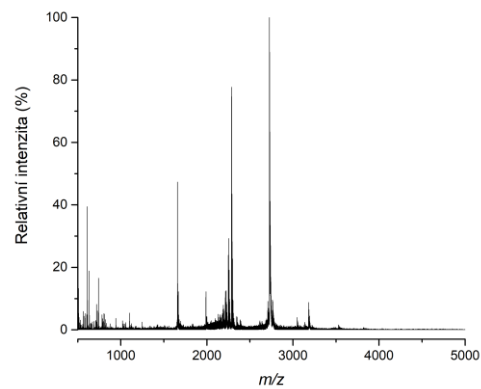
20 eV



30 eV



40 eV



50 eV

